

1864-35086
FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1904

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le JEUDI 30 JUIN 1904, à 1 heure

Par J. PERMILLEUX

VÉTÉRIINAIRE SANITAIRE DU DÉPARTEMENT DE LA SEINE

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE LA SORBONNE

Recherches de Physiologie Expérimentale

SUR QUELQUES

FERMENTS DU FOIE

Président : M. GILBERT, professeur

Juges : { MM. BOUCHARD, professeur
DESGREZ et VAQUEZ, agrégés

PARIS

IMPRIMERIE CHARLES LAMY

39, Rue Censier, 39

1904

36863

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen	M. DEBOVE
Professeurs	MM.
Anatomie	P. POIRIER
Physiologie	CH. RICHET
Physique médicale	GARIEL
Chimie organique et chimie minérale	GAUTIER
Histoire naturelle médicale	BLANCHARD
Pathologie et thérapeutique générales	BOUCHARD
Pathologie médicale	HUTINEL
Pathologie chirurgicale	BRISSAUD
Anatomie pathologique	LANNELONGUE
Histologie	CORNIL
Opérations et appareils	MATHIAS DUVAL
Pharmacologie et matière médicale	RECLUS
Thérapeutique	POUCHET
Hygiène	GILBERT
Médecine légale	CHANTEMESSE
Histoire de la médecine et de la chirurgie	BROUARDEL
Pathologie expérimentale et comparée	DEJERINE
	X...
Clinique médicale	HAYEM
	DIEULAFOY
	DEBOVE
	LANDOUZY
	GRANCHER
Maladies des enfants	JOFFROY
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale	GAUCHER
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	RAYMOND
Clinique des maladies du système nerveux	TERRIER
	BERGER
Clinique chirurgicale	LE DENTU
	TILLAUX
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires	GUYON
Clinique d'accouchements	BUDIN
	PINARD
Clinique gynécologique	POZZI
Clinique chirurgicale infantile	KIRMISSON
Professeurs honoraires : MM. JACCOUD, FOURNIER et FARABEUF.	

MM.

ACHARD
AUVRAY
BESANCON
BONNAIRE
BROCA (AUG.)
BROCA (ANDRÉ)
CHASSEVANT
CUNEO
DEMELIN
DEGREZ

Agrégés en exercice

DUPRE
FAURE
GOSSET
GOUGET
GUIART
HARTMANN
JEANSELME
LANGLOIS
LAUNOIS
LEGRY

LEGUEU
LEPAGE
MARION
MAUCLAIRE
MERY
POTOCKI
REMY
RENON
RIEFFEL (chef
des trav. anat.)

RICHAUD
TEISSIER
THIERY
THIROLOIX
THOINOT
VAQUEZ
WALLICH
WALTHER
WIDAL
WURTZ

Le Secrétaire de la Faculté : M. GRISEZ.

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

A LA MÉMOIRE DE MES PARENTS

A MA FEMME ET A MES ENFANTS

A MON MAITRE

M. DASTRE

PROFESSEUR DE PHYSIOLOGIE A LA SORBONNE

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR GILBERT

Professeur de Thérapeutique.

Médecin à l'Hôpital Broussais.

Chevalier de la Légion d'honneur.

PRÉFACE

Au moment de terminer nos études, non pour nous conformer à une coutume, mais obéissant à des sentiments bien sincères, nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont donné leur science et prodigué leurs conseils; ce sera peut-être l'unique occasion que nous aurons de le faire publiquement.

D'abord notre maître M. le professeur DASTRE, qui voulut bien nous permettre pendant trois ans d'étudier la physiologie dans son laboratoire si admirablement installé, a droit tout spécialement à notre reconnaissance. Nous garderons pendant longtemps le souvenir de sa bonté à notre égard; qu'il veuille bien recevoir ici l'hommage de notre gratitude.

Nous avons passé deux années dans le service de M. LETULLE, professeur agrégé, médecin à l'hôpital Boucicaut. Elles compteront parmi les meilleures de notre vie. Cet excellent maître nous a témoigné une grande bienveillance; nous sommes heureux d'avoir pu profiter d'un enseignement qu'il sait rendre si attrayant par le charme de sa parole. Nous le prions d'agréer nos sentiments de reconnaissance et de respectueux dévouement.

Nous exprimons notre gratitude à M. DOLÉRIS, accoucheur des hôpitaux, pour l'affabilité avec laquelle il a dirigé nos études obstétricales à la Maternité de l'hôpital Boucicaut.

A l'Hôtel-Dieu, nous avons été stagiaire dans le service de M. le professeur DE LAPERSONNE; nous avons pu profiter de ses excellentes leçons, nous l'en remercions vivement.

Nous n'aurons garde d'oublier M. le docteur PORTIER, préparateur à la Sorbonne, auquel nous sommes redevable, nous tenons à le proclamer, d'avoir pu mener à bien notre modeste travail. Pendant plusieurs années il n'a cessé, avec une courtoisie parfaite, de nous prodiguer ses conseils éclairés. Nous lui exprimons notre grande reconnaissance et le prions de croire à notre affectueux dévouement.

M. le docteur LAPICQUE, maître de conférences, à la Faculté des sciences, nous a initié aux dosages du fer dans l'organisme, en vue de recherches que nous pensons publier plus tard. Dans cette circonstance, comme dans toutes celles où nous avons fait appel à ses vastes connaissances, nous avons trouvé en lui, un conseiller dévoué qui toujours nous a prodigué sa science sans compter. Qu'il veuille donc bien accepter à cette place nos plus sincères remerciements.

Nous avons étudié la chimie urinaire avec autant de plaisir que de profit dans le laboratoire de M. BOUCHARD. Grâce à la grande obligeance de M. le professeur agrégé DESGREZ, nous pensons avoir acquis des notions très nettes sur cette importante question. Nous avons largement mis à contribution son érudition bien connue sur tout ce qui a trait à la chimie physiologique. Avec beaucoup de bonne grâce, de dévouement même, il a mis à notre portée sa vaste science et son grand sens pratique. Les questions qui nous avaient paru jusqu'ici peu compréhensibles, sont devenues, après ses explications, d'une simplicité extrême. Nous voudrions pouvoir le persuader que nous nous souviendrons toujours de sa grande amabilité et nous le prions de croire à notre vive affection.

Nous garderons toujours un bon souvenir de notre

passage dans ce laboratoire hospitalier, où nous avons souvent eu recours aux connaissances et à l'obligeance de Messieurs les professeurs agrégés CLAUDE et BALTHAZAR, pour nous familiariser avec la pratique de la cryoscopie.

Qu'il nous soit permis à l'occasion de notre thèse inaugurale d'adresser à notre oncle M. CHARLES LAMY, ingénieur des Arts et Manufactures, l'expression de notre reconnaissance bien vive pour la constante sollicitude et la bienveillance qu'il nous a témoignées pendant le cours de nos études médicales, et qui n'ont certainement pas peu contribué à nous aider dans le cours d'études aussi longues, et que l'on n'entreprend généralement pas à notre âge.

Nous adressons l'expression de notre vive reconnaissance à M. le Professeur GILBERT qui nous a fait le grand honneur de citer dans son remarquable ouvrage « *Les Fonctions hépatiques* » la communication que nous avons faite à la Société de Biologie en 1901, et qui a bien voulu accepter la présidence de notre thèse sur le même sujet, dont nous avons, il est vrai, élargi le cadre. La citation et l'acceptation de cet éminent maître nous sont une garantie que notre modeste étude, n'est peut-être pas dépourvue de tout intérêt.

Le travail que nous soumettons à l'appréciation de nos juges, dont nous sollicitons par avance l'indulgence, présente certainement beaucoup d'imperfections, nombre de points sont encore à élucider, et on peut évidemment lui reprocher de ne pas contenir beaucoup de faits nouveaux. Connaissant, mieux que personne, combien sont longues les recherches de physiologie, ils voudront bien, dans leur appréciation, tenir compte de notre bonne volonté. Nous espérons que leur bienveillance ne nous fera pas défaut. Nous n'avons eu que le désir d'apporter notre faible contribution à l'étude si intéressante mais si compliquée encore des ferments solubles.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153315_0048

CHAPITRE PREMIER

Introduction.

Nous passerons brièvement en revue ce qui a été fait depuis CLAUDE BERNARD jusqu'à notre époque, nous essaierons de montrer ce qui dans ces différents travaux n'est plus compatible avec l'état actuel de la science.

CLAUDE BERNARD en 1848 et 1857, par de mémorables travaux, montra que le sucre du foie vient du sang et que le foie contient du glycogène, transformable en sucre réducteur sous l'influence des acides. Ces deux faits sont le point de départ de toutes nos connaissances actuelles sur la fonction glycogénique du foie.

Il se demanda si cette transformation ne pouvait se faire en dehors des acides par ces substances nouvelles, *les ferments*, que l'on commençait déjà à étudier.

Il pensa le premier donner la preuve de l'existence d'un ferment soluble qui dans le foie transformerait le glycogène en sucre, par son expérience du foie lavé; nous rappelons la façon dont il opérait :

Le foie d'un animal abondamment nourri est extrait du corps aussitôt que l'animal a été sacrifié; par le bout hépatique de la veine porte, on injecte un courant d'eau qui entraîne le sang de l'organe et qui en même temps libère presque complètement le foie de son sucre. Ce lavage ne doit pas être poussé trop loin, car comme le fait remarquer CLAUDE BERNARD, le glycogène lui-même pourrait être entraîné.

Le foie ainsi lavé est partagé en deux portions, la première bouillie en milieu aqueux, la deuxième abandonnée à elle-même à la température du laboratoire. La recherche du sucre au bout de vingt-quatre heures était négative dans la première portion et positive dans la seconde, qui traitée de la même façon au bout du même temps réduisait la liqueur de Fehling et fermentait avec la levure de bière.

CL. BERNARD concluait d'une façon très ferme qu'un ferment soluble était intervenu pour transformer le glycogène en sucre réducteur et fermentatif.

On peut faire à cette expérience plusieurs objections :

1^o L'illustre physiologiste ne connaissant pas l'existence des bactéries, n'avait pris aucune précaution d'asepsie ; il pouvait au moment du lavage introduire des bactéries saccharifiantes capables de transformer le glycogène, et produire le phénomène observé ;

2^o Le lavage du foie qui n'était pas poussé très loin pouvait laisser dans les vaisseaux une certaine quantité de sang et par conséquent d'amylase et de maltase que nous savons maintenant exister dans ce liquide ;

3^o La transformation du glycogène eut-elle été réellement produite par le tissu hépatique lui-même, on n'était pas en droit d'affirmer qu'elle était due à un ferment soluble, puisqu'on n'avait pas séparé ce ferment de son substratum anatomique. (1).

Il est vrai que vers 1877 CL. BERNARD s'efforça d'isoler ce ferment. Pour cela, le foie lavé par un courant d'eau, était ensuite haché et plongé pendant deux ou trois jours dans quatre ou cinq fois son poids de glycérine. Cet extrait glycériné était précipité par l'alcool ; cette opération répétée

(1) 24 septembre 1855. Communication de CL. BERNARD à l'Académie des Sciences sur son expérience du foie lavé.

plusieurs fois donnait finalement un précipité qui, dissout dans l'eau, produisait une saccharification du glycogène ou de l'empois d'amidon.

A la vérité cette action se montrait assez faible, ce que CL. BERNARD attribuait à l'altération du ferment au contact prolongé de l'alcool.

Comme les expériences précédentes, celle-ci est passible des mêmes objections ; à savoir que des ferments figurés ont pu en imposer pour une action de ferments solubles.

*
* *

Cette question fut reprise d'abord par HENSEN (1) puis par VON WITICH (2), ces auteurs procédaient ainsi : le foie lavé, broyé avec du sable, traité par l'alcool est soumis à l'extraction par la glycérine. Cette solution glycérinée agissait très énergiquement sur l'empois d'amidon au bout de deux heures, pour le transformer en sucre réducteur. Ces physiologistes ne paraissent pas s'être mis à l'abri des microbes.

EPSTEIN et MULLER, cités par SEEGEN opèrent de même, avec cette différence cependant que le foie est reçu dans l'eau phéniquée.

En 1876, ABELES, professeur à Karlsbad reprend de nouveau la question (3) et il arrive à cette conclusion bien faite pour nous surprendre, que l'on peut extraire du foie même bouilli un ferment soluble agissant sur l'empois d'amidon, et cela au bout de plusieurs jours. Il se demande même si ce ferment n'est pas une formation *post mortem*. La lecture

(1) HENSEN. — Virchow's. Arch. Bd. XI.

(2) Ueber das Leberferment. — PFLUGER's f. Physiol., vol. 7, pages 28 à 32.

(3) Beitrag zur Lehre von den saccharificirenden Fermenten in thierischen Organismus. — Med. Jahrbücher II. Heft 1876.

attentive de son travail montre à l'évidence que ce sont les bactéries qui ont agi. ABELES isola même, dit-il, ce prétendu ferment et en vérifia l'activité.

MUSCULUS et von MERING (1) se basant sur ce que NASSE avait trouvé du glucose dans le foie après la mort, ont pu à nouveau vérifier ce fait. Dans les deux cas qu'ils rapportent, les organes provenaient de deux gros chiens bien nourris. Leurs recherches furent faites sur des organes prélevés soit une heure, soit cinq heures après la mort, dans les deux cas ils crurent pouvoir établir avec certitude l'existence du maltose.

FLORENCE EVES (2) en 1885 prend le foie d'un mouton aussitôt après la mort et le conserve aseptiquement jusqu'à ce qu'il fournisse un extrait aqueux dépourvu de glycogène. Ce foie haché finement est traité par de grandes quantités d'alcool à 95°, l'alcool est souvent renouvelé de façon à éliminer tout le sucre. On exprime alors le foie, on le dessèche à 30°; on fait digérer pendant 12 à 48 heures à 35° la poudre ainsi obtenue soit avec de l'eau thymolée soit avec une solution de chlorure de sodium de 1 à 10 %. Cette liqueur, ainsi obtenue, possédait une faible action diastatique sur l'empois d'amidon ou le glycogène. L'auteur n'a pu caractériser avec certitude la nature du sucre formé; il pense cependant qu'il se forme en partie du maltose, en se fondant sur ce fait unique que le pouvoir réducteur augmentait après ébullition en présence de l'acide sulfurique.

Ce résultat n'a pas lieu de nous surprendre puisque nous

(1) Ueber die Umwandlung von Stärke u. Glycogen durch Diastas, Speichel, Pancreas u. Leberferment. In Zeitschr. f. phys. Chemie 2, pages 403 à 419. Verl. Mitth. daselbst 1. 395.

(2) Some experiments on the liver ferment. Jour. of physiol. 5, pages 342 à 351. Physiol. Labor. Univer. Cambridge.

savons maintenant que le traitement prolongé par l'alcool à 95° annihile presque complètement la maltase pour ne laisser subsister que l'amylase.

On voit que toutes ces expériences sont justiciables des mêmes critiques, l'ingérence des bactéries et l'incertitude sur la nature de la substance réductrice formée.

SEEGEN et son collaborateur KRATSCHMER, (1) ayant constaté que le sucre du foie était du glucose et que ce glucose ne pouvait provenir de l'action d'une diastase agissant sur le glycogène, car on aurait eu du maltose et non du glucose, déclarèrent l'inutilité de rechercher le ferment glycosique.

Ils se demandèrent même si le sucre du foie provenait bien du glycogène, malgré sa constitution chimique voisine. Ils allèrent jusqu'à contester les résultats de la fameuse expérience du foie lavé de CL. BERNARD.

Pour eux, contrairement à ce qu'avait vu l'illustre physiologiste, non seulement il n'y a pas proportionnalité entre le glycogène disparu et le sucre formé, mais ils crurent prouver par des analyses que dans une première période, le sucre se forme sans que le glycogène varie et qu'ensuite le glycogène disparaît alors qu'il ne se forme plus de sucre.

D'après eux le sucre se formerait aux dépens des graisses et des albuminoïdes et le glycogène n'y serait pour rien. Ils conclurent que la théorie de CL. BERNARD était une erreur.

BOËM et HOFFMANN (2) reprirent les expériences de SEEGEN et affirmèrent à nouveau la théorie glycogénique. Ils montrèrent que dans le foie extrait du corps le glycogène et le sucre varient de façon inverse.

(1) PFLUGER'S. Arch. vol. XXII, p. 206. 1880.

(2) PFLUGER'S. Arch. vol. XXIII.

SEEGEN ne se tint pas pour battu et recommençant ses expériences il maintint ses conclusions pour le foie du chien et les abandonna pour le foie du lapin.

GIRARD (1) en 1887 dans le laboratoire de SCHIFF infirme d'une façon complète et définitive les travaux de SEEGEN, en montre les causes d'erreurs et remit en honneur les conclusions de CL. BERNARD.

* * *

M. DASTRE, après cette période d'incertitudes publie un mémoire très documenté (2). Il montre d'abord que le foie non plus lavé avec de l'eau, mais avec une solution physiologique de Na Cl, continue à transformer son glycogène en sucre et qu'il n'y a pas entraînement de la substance qui forme le sucre. Les lavages sont souvent faits avec des solutions refroidies ; de plus, ce physiologiste démontre qu'avec un lavage bien fait on peut, chez le lapin surtout, débarrasser complètement le foie du sucre qu'il contient.

Le premier, il cherche à se mettre à l'abri des bactéries en se servant de basses températures. Pour détruire les bactéries, sans altérer les ferments, il stérilise ses ballons par la tyndallisation au thermostat à 55°. Il rappelle cette conclusion singulière de SEEGEN et KRATSCHMER dans leur premier mémoire de 1877, que toute matière albuminoïde mise en présence de glycogène peut le transformer en sucre ; mais cette action est très lente, elle demande plusieurs jours. M. DASTRE démontre sans peine que ce sont les bactéries qui ont agi.

(1) PFLUGER's. Arch. vol. XLI, p. 294. 1887.

(2) Physiologie du foie. Recherches sur les ferments hépatiques. Archives de physiologie, p. 68 à 102, 1880.

CL. BERNARD (1), LÉPINE (2) avaient déjà dit que tous les albuminoïdes peuvent transformer l'amidon. Bien plus, SEEGEN et son collaborateur avaient déclaré que dans le foie de l'animal vivant, la saccharification est l'effet d'une diastase, tandis que ce phénomène après la mort est dû aux albuminoïdes.

Jamais, *sonte sua*, sans l'intervention bactérienne, les albuminoïdes ne peuvent transformer l'amidon ou ses isomères. Dans le mémoire dont nous parlons, l'action nocive de l'acidité dans la transformation de l'amidon est bien mise en évidence.

L'auteur nie l'existence d'un ferment glycosique dans le foie, par contre, il croit à la présence de l'invertine.

Cependant, M. DASTRE dit qu'il a rencontré une ou deux fois le ferment amylolytique dans le foie du chien ; il interprète ces faits contradictoires selon lui en supposant que c'est du froid (— 30°) auquel il a soumis l'organe qui a aidé au ferment à manifester son action. Il pensait qu'ayant annihilé l'activité cellulaire, la formation du sucre, qu'il considère comme une action vitale, devenait impossible.

On voit donc que ce physiologiste tout en niant l'existence du ferment glycosique a constaté deux fois la manifestation de son activité.

Il rapproche ces faits de ceux qu'il avait constatés plusieurs fois, à savoir, qu'un refroidissement considérable (— 50°) n'avait pas entravé l'action de l'enzyme gastrique, mais au contraire l'avait exaltée.

(1) Physiologie expérimentale, tome II. 1856.

(2) LÉPINE (Bericht d. R. Sächs. Gesell. d. Wissens 1870).

NASSE (1) en 1889 emploie le chloroforme pour séparer les processus vitaux des phénomènes purement fermentatifs.

Il additionne du chloroforme des morceaux de foie broyés dans l'eau, et il voit qu'au bout d'un certain temps le glycogène du foie est complètement saccharifié.

Répondant par avance à la critique de ses expériences, que l'activité propre du protoplasma aurait pu ne pas être détruite complètement par le CHCl_3 , NASSE prépare des extraits aqueux de foie et il voit que ces extraits en présence du chloroforme saccharifient complètement le glycogène et le maltose; mais par contre qu'ils n'avaient pas le pouvoir de saccharifier l'inuline et qu'ils n'avaient pas d'action sur le saccharose.

NASSE essaie, très judicieusement, de prouver l'existence de la maltase et nie celle de l'invertine et de l'inulase.

* *

KAUFMANN (2) en 1889, contrairement à M. DASTRE pense que l'action saccharifiante du foie est due à un ferment soluble. CHAUVEAU et CL. BERNARD, dit-il, ont toujours trouvé dans le sang des veines sus-hépatiques plus de sucre que dans les autres points du système circulatoire; ce fait démontre d'une façon évidente la fonction glycogénique du foie. KAUFMANN par une expérience très élégante pense qu'on peut retrouver le ferment glycosique dans les produits sécrétés par le foie et que si ce ferment se produit pendant la vie, on doit pouvoir dans certaines circonstances

(1) Ueber fermentative Vorgänge in den Organen des Thierkörpers in Naturforschende. Gesellsch. zu Rostock; unveränderter Abdruck a. d. Rustocker Ztg. 1889. Nov. 1815.

(2) Contribution à l'étude du ferment glycosique du foie. Compte rendu de la Société de Biologie., vol. 41. 1889, pages 600 à 603.

le mettre en évidence dans les produits d'excrétion de la glande hépatique. Le professeur d'ALFORT ne fait subir aucune action chimique au tissu hépatique, il recherche la diastase dans la bile du chien, du chat, du mouton, du bœuf, du porc; il emploie de la bile recueillie aseptiquement et filtrée sur filtre CHAMBERLAND; cette bile est prélevée tantôt dans la vésicule tantôt dans le canal cholédoque. Son distingué collègue NOCARD, constata que la bile ainsi recueillie ne contenait pas de microbes. L'expérimentateur après s'être assuré que la bile ne contenait pas de sucre, la faisait agir sur des solutions stérilisées d'empois d'amidon et il constatait au bout de quelques heures que ces solutions réduisaient abondamment la liqueur cupro-potassique. Seule la bile du chien s'est montrée peu ou pas saccharifiante.

Il conclut que le ferment glycosique est secreté par le foie, qu'il est ensuite versé dans l'intestin avec la bile et qu'il contribue à la digestion des matières amylacées. Il se demande pourquoi ce ferment n'existe pas dans la bile du chien, tandis que sa présence est constante dans la bile des herbivores et des carnivores. Chez le chien cette diastase est produite en quantité moindre, elle est complètement utilisée *in situ*, tandis que chez les autres animaux il y a surabondance et le surplus est éliminé par le *cholédoque*.

A notre avis, M. KAUFMANN a tiré de ses intéressantes expériences des conclusions qu'elles ne comportaient pas. Il a montré dans la bile de beaucoup d'animaux l'existence d'un ferment amylolytique, constatation digne d'intérêt, mais rien ne permet d'affirmer que le ferment ait été secreté par la cellule hépatique; peut-être pourrait-on aussi bien supposer que ce ferment n'est autre que l'hémodiastase qui a passé dans la bile.

Récemment, M. GILBERT a démontré que la bile contient presque toujours des microbes (microbisme biliaire.)

ARTHUS et HUBERT (1) en 1892 démontrent d'abord qu'on peut facilement se mettre à l'abri de l'action des bactéries, sans toucher aux ferments solubles, à l'aide de solutions de fluorure de sodium à 1 %. Les cellules et les bactéries perdent leur vitalité et les ferments conservent leur action ; on a ainsi un moyen aussi sûr que simple de séparer les phénomènes vitaux des phénomènes chimiques.

Ils s'assurent d'abord que le fluorure de sodium est incapable de transformer à lui seul le glycogène en sucre ; ils lavent un foie avec une solution de Na Fl à 1 %, après le lavage il ne contient plus de sucre, ils le hachent et le mettent dans une solution à 1% du même sel, 24 heures après ils constatent du sucre.

Cette expérience n'est autre que celle de CL. BERNARD faite dans des conditions d'asepsie.

Les auteurs conservent pendant deux semaines dans un cas, pendant quatre dans l'autre, des macérations hépatiques fluorées, les incorporent après ce temps avec des solutions de glycogène également fluorées ; ils mettent ces mélanges à l'étuve pendant 24 heures pour le premier cas et 48 pour le second.

Voici les résultats :

1^o *Macération hépatique conservée 15 jours.*

50 cc	Liquide hépatique contiennent.....	sucres.	0 gr 220
50 cc	Liquide hépatique bouillis, conservés à l'étuve à 40° pendant 24 heures.....	—	0 220
50 cc	Liquide bouillis — glycogène conservés à l'étuve à 40° pendant 24 heures.....	—	0 220
50 cc	Liquide non bouillis — glycogène conservés à l'étuve à 40° pendant 24 heures.....	—	0 280

(1) ARTHUS et HUBERT. — Ferments solubles et ferments figurés. Arch. de physiologie 1892, pages 658 à 670.

2^e *Macération hépatique conservée 4 semaines.*

50 ^{cc}	Liquide hépatique contiennent.....	sucr.	0 ^{gr} 310
50 ^{cc}	Liquide hépatique bouillis, conservés 48 heures à l'étuve contiennent.....	—	0 310
50 ^{cc}	Liquide hépatique — glyco-gène conservés 48 heures à l'étuve contiennent.....	—	0 448
50 ^{cc}	Liquide hépatique bouillis — glyco-gène conservés 48 heures à l'étuve contiennent.....	—	0 310

Ces expériences sont beaucoup plus concluantes que les précédentes pour mettre en évidence l'influence d'un ferment transformant le glycogène en substance réductrice, mais elles ne sont pas à l'abri de tout reproche. Les auteurs n'indiquent pas, il est vrai, les quantités de glycogène mis en jeu, mais en tout cas l'action est très faible, 0^{gr} 06 dans un cas pour 24 heures, et 0^{gr} 13 dans l'autre, pour 48 heures.

On peut se demander si cette faible transformation, ne serait pas en partie due à l'action des bactéries, car récemment, on a montré qu'une teneur en fluorure à 1 %, n'était pas suffisante pour maintenir stériles des macérations pendant plusieurs jours, et à plus forte raison pendant des semaines.

Cette intervention est peu probable, mais elle est possible.

..

M. C. RICHET (1894) (1), qui le 21 mai de la même année avait étudié la formation de l'urée après la mort (2) montre d'une façon très évidente l'action du ferment amylo-lytique du foie, en se mettant de la façon la plus absolue à l'abri des bactéries par l'emploi du fluorure de sodium.

(1) C. RICHET. — De la diatase uropoïétique. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 9-23 juin 1894, p. 525.

(2) C. RICHET. — De la formation de l'urée dans le foie après la mort. *Comp. rend. Acad. des Sciences*, 21 mai 1894.

Toujours les expériences sont comparatives; dans ce travail le professeur RICHET prouve l'existence dans le foie d'un ferment uréopoiétique.

En lisant ce travail on voit que dans le flacon non bouilli, c'est-à-dire dans le flacon où les ferments peuvent manifester leur action, le glycogène diminue et l'urée augmente; tandis que dans le flacon bouilli où la chaleur a annihilé l'action des ferments la teneur de ces deux substances reste invariable. 43 dosages ont été faits dans cette étude.

En 1897, M. RICHET et M. CHASSEVANT (1) reprirent cette question et cherchèrent aux dépens de quelles substances se formait l'urée; ils conclurent :

1^o Que la formation de l'urée se fait au moyen d'un ferment soluble ;

2^o Que dans les conditions de leur expérience la transformation des matières azotées en urée ne porte ni sur les sels ammoniacaux, ni sur les matières albuminoïdes (au moins directement) mais sur certaines matières albuminoïdes cristallisables, et entre autres sur l'acide urique.

Enfin ces mêmes auteurs en 1898 (2), d'après de nouvelles expériences conclurent à l'absence du ferment uréopoiétique dans le foie des oiseaux.

*
* *

BUTTE (3) en 1894 établit que, contrairement à l'opinion de SEEGEN, du sang défibriné ajouté à de la macération de foie accélère la transformation de glycogène

(1) C. RICHET et A. CHASSEVANT.—Des ferments uréopoiétiques du foie. *Compt. rend. Soc. de Biol.* 1897, p. 743.

(2) C. RICHET et A. CHASSEVANT. — Absence du ferment uropoiétique dans le foie des oiseaux.

(3) Action du sang sur la fonction glycogénique du foie. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1894, vol. XLVI, p. 387.

en sucre. Ce fait est peu important et pouvait être prévu à l'avance puisque nous savons qu'une maltase énergique existe dans le sang.

CAVAZZANI (1) en 1894 cherche surtout à voir les relations qui existeraient entre le pouvoir saccharifiant du sang et la formation du sucre dans le foie. Il montre d'abord par des recherches comparatives que dans le cas de la surproduction du sucre par le foie, le pouvoir saccharifiant du sang et du parenchyme hépatique ne sont pas augmentés; il prouve ensuite que ce même pouvoir dans le sang des veines sus-hépatiques reste constant, que ce sang provienne d'un foie normal ou d'un foie en suractivité par excitation du plexus coeliaque. Même conclusion en ce qui concerne le parenchyme du foie. CAVAZZANI cherche ensuite le rapport existant entre l'absence des ferments glycosiques dans le sang et la lenteur de la formation du sucre dans le foie.

Il rappelle que le professeur allemand BIAL a établi que le sang du fœtus est dépourvu de ferments (2) et que BUTTE pense avoir démontré que la transformation du glycogène en glucose est très lente dans le foie du fœtus. CAVAZZANI montre enfin que lorsqu'on mélange du sang et du glycogène, celui-ci n'est pas saccharifié au bout de cinq à dix minutes, tandis qu'après une excitation appropriée, le sang du foie montre une hyperglycémie au bout de deux minutes; se basant sur ce fait, il en conclut que la transformation du glycogène en glucose se produit non extérieurement, mais intérieurement aux cellules hépatiques, c'est donc un *processus* endo-cellulaire.

(1) Sul meccanismo della trasformazione del glicogeno in glicisio nell'organismo. *An. di Chimicica*, sept. 1894.

(2) BIÉRRY a depuis prouvé que l'on trouve des ferments dans le sang du fœtus; il les a étudiés surtout chez les fœtus des bovidés. Voir *Compt. rend. Soc. Biol.*, 15 décembre 1900.

NIKITA CHODSCHAJEN en 1898. « Les Enzymes sont-elles dialysables ? » (1).

Cet auteur met en évidence que les solutions de diastases, et en particulier celles d'invertine peuvent traverser les dialyseurs mais avec une extrême lenteur.

Enfin, nous-même en 1901 (2) avons réussi en employant la dialyse chloroformique, comme il sera dit, à isoler un ferment amylolytique dans le foie et à caractériser la nature du sucre hépatique en nous servant de la méthode des osazonés. C'est le résultat de ces recherches, augmenté il est vrai, qui feront la suite du présent mémoire.

VICTOR HENRI (3) a étudié dans le laboratoire russe de zoologie de Villefranche-sur-Mer les ferments amylolytiques du suc pancréatique chez l'octopus vulgaris, la sepia officinalis, le spatangus purpureus, la salpa africana; chez tous ces êtres il a toujours réussi avec LALOU, en faisant des fistules dans la partie terminale du cœcum spiralé, à recueillir une amylase très active; il a aussi dans ce même suc trouvé un ferment protéolytique.

Ces recherches très intéressantes démontrent d'une façon évidente que l'hépatopancréas des invertébrés étudiés contient un ferment glycosique.

M. HENRI par d'autres observations dit qu'il est permis d'étendre aux invertébrés tels que le Poulpe ce qui a été vu sur les animaux supérieurs, à savoir que la sécrétion des glandes digestives varie suivant l'état de digestion;

(1) *Archives de Physiologie*, 1898, page 241.

(2) PERMILLEUX. — Recherche du ferment amylolytique. Dosage de l'amidon transformé. *Compt. rend. de la Soc. de Biologie*, 12 janvier 1901, tome LIII, page 33.

(3) HENRY. — Étude des ferments digestifs chez quelques invertébrés. *Compt. rend. de la Soc. de Biologie*, 14 novembre 1903, tome LIV, p. 1314.

il dit avec raison qu'il semble y avoir là une loi de physiologie générale du plus haut intérêt.

*
* *

Avant de terminer cet exposé historique, il ne faut pas oublier de dire qu'en 1903 et 1904, nombre de savants étrangers, s'inspirant de la remarquable découverte de BÜCHNER, cherchèrent en utilisant sa méthode à extraire quelques ferments dans le foie.

Il n'est pas inutile de rappeler très brièvement la sensationnelle découverte de BÜCHNER (1).

Il a montré qu'en employant des moyens spéciaux (destruction mécanique de la cellule suivie d'une compression de 400 à 500 atmosphères) on obtient un suc cellulaire capable à 30° de transformer très vite le glucose en alcool et acide carbonique.

Ce suc cellulaire conserve ses propriétés même lorsqu'il a traversé un filtre en porcelaine, ou lorsqu'on l'additionne d'antiseptiques qui empêchent la levure de se développer.

On a donc affaire à une zymase. BÜCHNER a bien isolé le ferment soluble alcoolique qui peut agir *in vitro* en dehors de la cellule.

Nous ne ferons pas ici l'analyse et la critique des recherches allemandes, notamment de celles de STOCKLASA et de SIMACECK, elles feront l'objet de la 2^e partie de ce mémoire.

(1) H. BUCHNER. — Die Bedeutung der activen löslichen Zellproducte für den Chemismus der Zelle. *München. Med. Wochenschrift*. XLIV. 12. S. 299.

CHAPITRE II

État actuel de la Question.

En résumé, CL. BERNARD, HENSEN, VON WITICH, EPSTEIN et MULLER croyaient avoir isolé le ferment amylolytique dans le foie, SEEGEN et KRATZSCHMER en niaient l'existence, ARTHUS, HUBERT, C. RICHET en ont manifesté l'action.

Les conclusions que M. DASTRE avait tiré de ses recherches, et qui furent aussi celles de PATON en Angleterre, étaient que ce ferment n'avait pas d'existence en dehors de la cellule; c'était un ferment endo-cellulaire utilisé sur place au moment de sa production, il n'agissait qu'au lieu où il prenait naissance.

Pour ce physiologiste, l'action chimique de ce ferment est si voisine de l'acte vital ou physiologique qui le produit, qu'il est fort difficile de dissocier ces deux phénomènes.

Ce même ferment dans le pancréas est, au contraire, le type des ferments exo-cellulaires; il agit en dehors de son lieu de production et conserve son activité pendant fort longtemps.

Comme le dit très bien le professeur de la Sorbonne ces ferments se distinguent chronologiquement et topographiquement.

Il est peut-être possible de rendre exo-cellulaire cette diastase, en employant des moyens énergiques qui la désintègreront du protoplasma auquel elle semble très adhérente. C'est précisément grâce à l'emploi de l'un de ces moyens énergiques qu'est due la précieuse découverte de BÜCHNER.

Sur les conseils de notre maître, nous avons repris la question, pensant qu'en dehors des moyens violents pour extraire les ferments de leur substratum, on peut employer des actions qui exaltent leur production et les font sourdre à l'extérieur des cellules.

D'après les indications de M. DASTRE, nous avons employé la dialyse chloroformique (1) qui nous a toujours réussi pour isoler le ferment amylolytique.

Nous rappelons en quoi consiste ce phénomène : Un tissu végétal ou animal exposé aux vapeurs de chloroforme ou d'éther laisse exsuder une quantité de liquide plus ou moins grande ; c'est le fait que RAPHAËL DUBOIS a nommé : *Déshydratation chloroformique*.

Il y a plus qu'une simple déshydratation, car ce qui s'écoule est un véritable suc cellulaire.

L'exoplasma dit M. DASTRE n'est hémi-perméable qu'au début de l'opération et pendant très peu de temps, il laisse passer ensuite des substances diverses ; il se comporte donc comme un filtre ou un dialyseur.

En 1901, au moment de notre communication à la Société de Biologie, M. DASTRE disait qu'il serait utile de savoir si le ferment amylolytique du foie, que nous avons toujours réussi à faire agir efficacement sur l'empois d'amidon est une amylase vraie ou une maltase.

Depuis cette époque, nous avons, croyons-nous, résolu la question ; chemin faisant, nous avons aussi déterminé la nature du sucre hépatique et celle du sucre obtenu en faisant agir les ferments hépatiques sur des solutions d'empois d'amidon ou de glycogène.

(1) DASTRE. — De la dialyse chloroformique comme moyen de recherche des ferments endo-cellulaires. *Compt. rend. de la Société de Biologie*, 12 janvier, page 35.

Nous avons été moins heureux en ce qui concerne nos recherches sur l'invertine, la lactase et le ferment glycolytique.

En hydrotomisant le foie avec la solution de RINGER qui est encore plus physiologique que celle contenant 7, 5 ‰ de chlorure de sodium, ou encore en employant sur le foie lavé soit l'action des basses températures soit celle de l'eau chloroformée sous pression, peut-être même en faisant à l'abri des microbes des macérations hépatiques dans des solutions concentrées d'urée, serions-nous arrivé à des résultats plus complets.

Nous nous en sommes tenu à la dialyse chloroformique, excepté pour ce qui concerne la dernière partie de ce mémoire où nous avons emprunté la méthode de BÜCHNER; nous nous réservons d'essayer les méthodes ci-dessus pour des recherches ultérieures.

CHAPITRE III

Technique.

I. — **Lavage du Foie.**

Un flacon de MARIOTTE d'une contenance de 5 litres portant une tubulure à sa partie inférieure, est suspendu à une hauteur de 1 m 35. On aura ainsi une pression constante de 10 centimètres de mercure, quand on ouvrira le robinet pour laisser écouler le liquide dans le tube de caoutchouc qui est adapté à la tubulure.

Ce tube, terminé par une canule, a un diamètre à peu près égal à celui de la veine porte d'un chien de taille moyenne.

On remplit le flacon avec de la solution physiologique (eau contenant 7, 5 ‰ de Na Cl) qui a été au préalable bouillie pour éviter l'action des microbes, et ensuite filtrée.

L'eau salée est mise dans le bocal à une température de 35 — 40°, on la maintient à cette même température pendant tout le temps que dure le lavage.

Le chien fixé sur la table d'opération est sacrifié par la section du cou ; immédiatement après, on rase la paroi abdominale au niveau de la ligne blanche, et l'on incise en arrière de l'appendice xyphoïde sur une longueur de 15 centimètres.

A l'aide des deux forts écarteurs, les lèvres de la plaie sont écartées, et les anses intestinales réclinées à droite ou à gauche. Il est alors facile d'arriver à la veine porte,

sur laquelle on place deux ligatures, l'une définitive sur le bout intestinal et l'autre provisoire sur le bout hépatique.

On incise la veine de façon à pouvoir introduire la canule à son intérieur, cette canule est fixée solidement sur la ligature provisoire qui devient ainsi définitive.

Cela fait, on desserre un peu la pince à vis placée sur le trajet du tube; l'eau traverse lentement le foie, gagne la veine cave inférieure par les veines sus-hépatiques et parvient dans l'oreillette droite; de là elle s'engage dans la veine cave supérieure et ressort par les jugulaires. La fin de l'opération est indiquée lorsque le liquide ressort complètement clair.

Au bout d'une heure, le foie est décoloré presque complètement; on continue le lavage jusqu'à ce que l'organe présente partout une teinte jaune très pâle; si quelques-unes de ses parties restent rouges, on les malaxe doucement avec la main tout en continuant le lavage. Avec 40 à 12 litres de solution, on parvient toujours à un résultat très suffisant surtout chez les jeunes animaux.

Le foie enlevé de suite, est rapidement découpé en minces lanières, pour augmenter la surface qui sera mise en contact avec les vapeurs chloroformiques. Autant que faire se peut, les conditions d'asepsie sont observées.

II. — **Dialyse chloroformique.**

Ces minces lanières sont suspendues à un crochet situé à la partie supérieure d'une cloche à vide; sur le plateau où elle repose sont disposés 4 ou 5 petits cristallisoirs remplis de chloroforme.

Le liquide exsudé par le foie est reçu dans un verre contenant dans certains cas une solution de Na Fl; sur ce

verre est placé un entonnoir garni avec un peu de coton de verre et à travers lequel filtre le liquide hépatique.

Le vide est fait avec la trompe; avant de fermer le robinet il faut absolument s'assurer que les cristallisoirs contiennent encore du chloroforme. On laisse ainsi pendant vingt-quatre heures.

Le liquide recueilli est opalescent et sirupeux, cette consistance et cette couleur sont dues en grande partie au glycogène.

M. DASTRE appelle dialyse chloroformique le phénomène qui se passe; ce n'est pas une simple déshydratation comme le croyait M. RAPHAËL DUBOIS, car ce qui s'écoule est un véritable suc cellulaire qui a forcé l'exoplasma.

III. — **Élimination du sucre et du glycogène dans les liquides exsudés.**

Dans certaines expériences dont les conditions seront déterminées ultérieurement, le liquide d'extraction contenait du glycogène en proportion difficile à doser et des sucres réducteurs glucose et maltose. Nous ne pouvions songer à faire agir cette liqueur complexe sur l'amidon ou le glycogène; il eut été difficile sinon impossible de caractériser et de doser les produits de transformation de ces dernières substances, au milieu de ceux qui existaient primitivement dans la liqueur.

Aussi nous a-t-il paru indispensable d'éliminer d'abord de notre liqueur hépatique toute trace de glycogène ou de sucres réducteurs, avant de la faire agir sur le corps choisi (amidon, glycogène, lactose, saccharose, maltose, inuline).

Plusieurs procédés nous ont servi pour cette élimination.

Voici la description de celui auquel nous nous sommes

arrêté en dernier lieu et qui en quelque sorte les synthétise tous :

Le liquide hépatique, ou dans d'autres cas la poudre de foie, est placé dans un dialyseur en baudruche ou en collodion contenant du Na Fl à saturation.

Les dialyseurs en collodion sont d'abord immergés pendant 5 minutes dans de l'eau contenant H Cl (5 %) pour enlever toute trace d'hydrogène sulfuré ; on s'assure de leur bonne qualité à l'aide d'une solution d'hémoglobine. Cette dernière précaution est aussi employée pour les dialyseurs en baudruche après avoir constaté qu'ils ne contiennent pas trace d'amidon.

Le dialyseur plonge dans un vase également rempli d'eau fluorée, le tout est placé à l'étuve à 40° . Le liquide entourant le dialyseur est constamment renouvelé par l'arrivée goutte à goutte (ou en mince filet) d'une solution de fluorure placée extérieurement.

Un trop plein convenablement réglé conduit à l'extérieur le liquide qui a servi.

A la température de 40° le liquide hépatique transforme rapidement son glycogène en sucre réducteur qui par la dialyse est facilement éliminé au fur et à mesure de sa production.

Souvent au bout de 3 jours, le liquide du dialyseur ne contient plus ni glycogène ni sucre ; on peut alors le faire agir sur les diverses substances et interpréter avec discernement les résultats obtenus.

Dans les cas où l'on dialysait en ne renouvelant l'eau que toutes les 12 heures, il fallait en moyenne 6 jours pour terminer l'opération. Une fois, même au bout de 8 jours, nous avons retrouvé du sucre dans le liquide dialysé ; c'est même cette circonstance qui nous a engagé à chercher la modification précédente.

IV. — Répartition du liquide dans deux ballons dont un sert de témoin.

Le liquide était réparti par portions égales dans deux ballons contenant très exactement le même poids de la matière sur laquelle on désirait étudier l'action des ferments.

Un des ballons porté à l'ébullition pour annihiler l'action des ferments servait de témoin.

Dans le ballon bouilli (1), on devait toujours retrouver la matière incorporée intacte quant à sa constitution chimique; s'il en était autrement, c'est que cette substance était impure (par exemple, saccharose contenant du glucose, inuline contenant des substances réductrices); dans ce cas l'on devait considérer l'expérience comme nulle, ou rattacher la transformation observée à une autre cause qu'à celle des ferments.

Cette précaution d'avoir un témoin est absolument indispensable dans ces sortes de recherches.

Dans le flacon non bouilli, si la transformation était constatée, c'est que les ferments avaient agi et l'on était en droit de considérer l'expérience comme positive.

Il est inutile de dire que si la température à 100° pouvait modifier la constitution chimique des substances étudiées (saccharose, inuline), ces substances étaient ajoutées après refroidissement.

Le fluorure a toujours été employé en solutions à 2 ou 3% pour éviter l'action microbienne.

(1) Pour faciliter la lecture et l'intelligence du texte, ce flacon sera toujours désigné par la lettre B.

V. — **Traitement des liquides au sortir de l'étuve.**

Tous nos liquides contenaient des substances albuminoïdes qui nous auraient gêné dans la suite des manipulations (constatation du sucre au moyen de la liqueur de Fehling, étude de leur nature par la phénylhydrazine, examen polarimétrique, etc.).

Nous avons employé successivement différentes méthodes pour nous débarrasser des albuminoïdes.

1^{er} PROCÉDÉ. — *Coagulation par l'acétate de soude et la chaleur.*

Le liquide albumineux est additionné d'acétate de soude et porté à l'ébullition (on a laissé tomber dans ce liquide quelques gouttes d'une solution de perchlorure de fer qui a été obtenue en diluant la solution officinale à 5 % dans l'eau distillée.)

Il se produit un précipité de sous-acétate de fer qui englobe les matières albuminoïdes et par filtration, on a un liquide clair dépourvu de ces substances. Une certaine quantité de sucre reste adhérente au précipité, aussi est-il nécessaire si l'on veut faire un dosage, de reprendre précipité et filtre plusieurs fois par l'eau bouillante et la presse. Toutes les eaux de lavage sont réunies au premier filtrat ; la totalité du liquide ainsi obtenu ramené au même volume pour chacun des ballons, était dosée au moyen de la liqueur de Violette ferrocyanurée (procédé de CAUSSE, modifié par ARTHUS.)

La réduction de la liqueur de Fehling se faisait à l'abri de l'air, dans un ballon où l'on maintenait constamment une légère ébullition ; nous ne croyons pas devoir décrire le dispositif employé qui est bien connu du reste.

2^e PROCÉDÉ. — *Précipitation par les sels de mercure ou de plomb.*

Ce procédé employé dans les dernières expériences, consiste à additionner la liqueur albumineuse d'une certaine quantité de nitrate mercurique (solution à 40 %). Le filtrat était neutralisé par de la lessive de soude, l'excès de mercure éliminé par l'hydrogène sulfuré; une nouvelle filtration donnait un liquide clair qu'on portait à l'ébullition pour chasser H²S. Le liquide ainsi obtenu était neutralisé et amené à un volume déterminé; on pouvait alors faire les dosages désirés par les procédés de réduction et rechercher la nature des sucres au moyen de la phénylhydrazine.

Rien de particulier à dire de la défécation des liquides par l'acétate de plomb dont on se débarrassait de l'excès par le sulfate de soude, c'est le procédé couramment employé.

VI. — **Différenciation des sucres par la Phénylhydrazine.**

Dans nos liquides d'expérience, privés de substances albuminoïdes, la liqueur de Fehling nous indique bien la présence d'un sucre réducteur, mais elle ne nous renseigne pas sur sa nature.

Dans le cas de la transformation de l'amidon par exemple, elle ne nous dit pas si le sucre formé est du maltose ou du glucose, question cependant intéressante à résoudre.

Les combinaisons avec la phénylhydrazine, découvertes par E. FISCHER, vont nous fournir un moyen de résoudre cette question.

Si on additionne la solution d'un sucre réducteur d'une quantité convenable d'acide acétique et de phénylhydrazine, il se forme à froid une première combinaison entre le sucre

et la phénylhydrazine. Une molécule de phénylhydrazine s'unit à chaque molécule de sucre pour donner naissance à un composé connu sous le nom d'hydrazone.

Cette hydrazone est d'ailleurs très soluble dans l'eau et ne peut être utilisée pour la diagnose des sucres, (exception doit être faite pour l'hydrazone du mannose qui cristallise instantanément).

Au bain-marie à 100° une seconde molécule de phénylhydrazine se fixe sur la molécule de sucre et donne naissance à un nouveau composé connu sous le nom de phénylosazone ou par abréviation d'osazone.

Les osazones des différents sucres sont des composés de couleur jaune, insolubles dans l'eau froide, se distinguant les uns des autres par les caractères suivants :

- 1° Forme cristalline ;
- 2° Solubilité ou insolubilité dans l'eau chaude ;
- 3° Solubilité ou insolubilité dans divers réactifs tels que les alcools méthylique, éthylique, l'acétone, etc. ;
- 4° Point de fusion.

Au sujet du point de fusion, une remarque s'impose ; le mode opératoire doit être le suivant, comme l'a indiqué M. GABRIEL BERTRAND :

L'osazone est préalablement purifiée, séchée, et réduite en poudre. Une petite quantité de cette poudre est projetée sur le bloc Maquenne préalablement chauffé à une température déterminée. Si le fragment pulvérulent d'osazone persiste sur le bloc pendant un temps appréciable, c'est que l'on n'a pas atteint la température de fusion ; on élève alors lentement la température du bloc en recommençant de temps à autre à projeter quelques particules à sa surface. Il arrive un moment où ces particules fondent instantanément :

c'est cette température qui doit-être retenue comme température de fusion de l'osazone, c'est la *fusion instantanée* de G. BERTRAND.

Il est absolument essentiel d'opérer de la façon que nous venons d'indiquer, car une osazone chauffée quelques instants à une température inférieure à celle de son point de fusion, se décompose peu à peu et il en résulte une incertitude au sujet de la détermination du point de fusion.

C'est pour n'avoir pas tenu compte de ce fait que la plupart des auteurs, et FISCHER lui-même, ont donné pour les différentes osazones des températures de fusion manifestement fausses.

Au contraire, en opérant comme nous venons de le dire, on a, pour les osazones des différents sucres, des points de fusion parfaitement exacts et assez différents les uns des autres.

Résumé des caractères des Osazones utilisées dans ce travail :

1^o *Phénylglucosazone* ou plus simplement glucosazone se forme par l'action de la phénylhydrazine, dans les conditions sus-indiquées avec le glucose et le lévulose. Elle donne des cristaux formés de grandes aiguilles jaunes disposées en branches de genêt; elle est insoluble dans l'alcool méthylique même bouillant ce qui permet de la purifier. Point de fusion instantanée 230° ;

2^o *Phénylmaltosazone* ou maltosazone, caractéristique du maltose, forme des cristaux jaune pâle, réunis en rosaces, solubles dans l'eau bouillante, dans l'acétone étendue à 50% d'eau, dans l'alcool méthylique. Point de fusion instantanée 198 à 200° (GRIMBERT);

3^e *Phényllactosazone*, ou par abréviation *lactosazone*, donne des cristaux réunis en forme d'oursins, solubles dans l'eau bouillante, dans l'alcool éthylique, l'alcool méthylique, l'acétone étendue de 50 %. Point de fusion 214°. Bouillie avec une solution très étendue d'acide sulfurique, elle se transforme en un anhydride insoluble dans l'alcool étendu.

Nous allons maintenant exposer quelques-unes des expériences que nous avons faites sur le suc hépatique recueilli et traité comme il vient d'être dit dans la technique exposée.

Nous ne retiendrons de notre cahier qu'une ou deux expériences dans chaque type, cela pour éviter des redites qui n'apporteraient rien de plus à nos conclusions.

Comme on le verra, nous publions aussi nos expériences négatives ; si les expériences positives ont infiniment plus de valeur, il ne faut pas rejeter systématiquement les autres ; nous y attachons un intérêt surtout en ce qui a trait au travail fait avec la poudre de foie, obtenue selon la méthode de BÜCHNER ; enfin, si quelques chercheurs lisent notre étude, (le hasard est si grand), ils ne perdront pas leur temps à employer les méthodes qui ne nous ont pas réussi, ou, s'ils les emploient, ils sauront les modifier de façon à arriver à de meilleurs résultats.

CHAPITRE IV

Recherche des ferments dans le foie lavé.

Ferment amylolytique

Transformation de l'amidon en sucre.

EXPÉRIENCE. — Chien 2 ans. 20 kilos. Sacrifié par la section du cou et après une injection de morphine. Foie lavé avec la solution physiologique à 7 ‰ (1). Durée du lavage 20 minutes. Foie normal et bien décoloré pesant 575 gr.

Le foie coupé en lanières minces a été exposé pendant 4 jours aux vapeurs de chloroforme dans une cloche où l'on a fait le vide.

Liquide recueilli 75 cc. On fait les 2 flacons suivants qu'on porte à l'étuve :

A	{	Liquide hépatique <i>non bouilli</i>	35 cc.
		Solution d'empois d'amidon à 2 ‰.....	50 cc.
		Solution de Na Fl à 2 ‰.....	50 cc.
B	{	Liquide hépatique <i>bouilli</i>	35 cc.
		Solution d'empois d'amidon à 2 ‰.....	50 cc.
		Solution de Na Fl à 2 ‰.....	50 cc.

Par quelques gouttes d'acide acétique on rend ces deux

(1) Bien entendu, cette solution est stérile, puisqu'elle a été bouillie. Pendant toute la durée du lavage, la température du liquide a été maintenue à 35-40°.

liquides franchement neutres. Au sortir de l'étuve, on a dans les 2 flacons précipité les matières albuminoïdes, filtré, puis par évaporation ramené à 100 cc. le volume des liquides provenant de chacun des flacons.

On a fait toutes les manipulations nécessaires pour extraire tout le sucre (presse à sang, reprise par l'eau bouillante du culot, etc.).

Le sucre a été dosé par une liqueur de Violette décime, c'est-à-dire dont 10 cc. correspondent à 5 mmgr de glucose.

RÉSULTATS. (1) — Le liquide bouilli ne contenait pas de glucose, le non bouilli en contenait 0^{gr} 44 ; presque la moitié de l'amidon avait été transformée en sucre.

CONCLUSION. — Il y a donc dans le liquide hépatique un ferment amylolytique.

REMARQUE. — Le liquide hépatique renfermant habituellement une notable quantité de glucose, l'absence complète de ce sucre dans le flacon bouilli ne tiendrait-elle pas à la présence d'un ferment glycolytique, qui aurait détruit ce sucre pendant les 4 jours que le liquide est resté sous la cloche. Une expérience sera faite pour vérifier cette hypothèse.

S'il y a un ferment glycolytique, notre conclusion serait encore vraie *a fortiori*.

(1) Le chloroforme avait été chassé par l'ébullition, car sans cette précaution, l'expérience n'aurait plus de signification étant donné le pouvoir réducteur de cette substance.

Transformation de l'amidon en sucre.

EXPÉRIENCE. — Chien de race commune, 4 ans. Tué par la section du cou. Foie lavé avec la solution physiologique à 7 ‰. Durée du lavage 1 heure. Quantité de liquide employée 12 litres. Le liquide servant au lavage a été bouilli et maintenu à 37°-40° pendant toute la durée de l'opération. Le foie normal bien décoloré pèse 600 grammes. Le liquide qui s'en écoule contient beaucoup de glycogène et peu de sucre.

On coupe en lanières minces, que l'on soumet pendant 2 jours, à l'action des vapeurs chloroformées dans une cloche où le vide a été fait. Le vase où est reçu le liquide exsudé contient de l'eau fluorée à saturation. On recueille 80 cc. d'un liquide rougeâtre, de consistance sirupeuse contenant encore beaucoup de sucre et plus du tout de glycogène.

On fait avec ce liquide les deux lots suivants :

A	{	Liquide hépatique	40 cc.
		Empois d'amidon à 2 ‰	50 cc.
		Na Fl à 2 ‰	50 cc.
B	{	Liquide hépatique <i>bouilli</i>	40 cc.
		Empois d'amidon à 2 ‰	50 cc.
		Na Fl à 2 ‰	50 cc.

On porte à l'étuve, on acidifie légèrement pour combattre l'alcalinité de Na Fl, de manière à avoir un milieu neutre, condition favorable pour l'action des ferments.

Au bout de 20 heures, les flacons sont retirés et examinés. Toutes les manipulations nécessaires sont faites pour précipiter les albuminoïdes et recueillir tout le sucre formé.

RÉSULTAT. — Le sucre dosé dans chaque flacon montre qu'il y en a 0^{gr} 43 de plus dans le flacon non bouilli. Ici encore il y a eu une saccharification abondante.

CONCLUSION. — Nous pouvons comme dans l'expérience précédente affirmer que notre liquide contient un ferment capable de transformer de l'empois d'amidon en sucre réducteur; ce ferment est-il une amylase ou une maltase? nous n'en savons rien; le sucre sucré formé est-il du maltose ou du glucose? nous ne le savons pas davantage.

REMARQUE. — S'il y avait eu du glycogène dans notre liquide au sortir de la cloche, nous l'aurions porté pendant 24 ou 48 heures à l'étuve (1) pour que tout ce glycogène se transformât; après cela seulement nous aurions ajouté l'empois d'amidon.

(1) En se préservant des microbes à l'aide du fluorure.

Transformation du glycogène.

EXPÉRIENCE. — Chien de race commune, bien portant, à jeun depuis 24 heures. Foie normal, lavé avec 6 litres de solution physiologique bouillie. Durée du lavage 1 heure.

Comme dans les expériences précédentes, de minces lanières sont soumises, dans une cloche à vide, à l'action des vapeurs chloroformiques.

On a recueilli 130 cc. de liquide hépatique contenant sucre et glycogène. Pour éliminer ces deux substances on a d'abord porté à l'étuve pendant 48 heures, après avoir ajouté volume égal de Na Fl à 2 %.

Au sortir de l'étuve on soumet à la dialyse à l'eau courante pour éliminer tout le sucre.

Ce résultat est obtenu au bout de 4 jours seulement. La température du laboratoire était de 20°, de sorte que si la transformation du glycogène n'avait pas été complète dans l'étuve, elle pouvait se terminer facilement à la température où l'on opérait.

On prépare alors les 2 ballons suivants qui sont portés de nouveau à l'étuve pendant 12 heures seulement.

A	{	Liquide hépatique.....	50 cc.
		Na Fl à 3 %.....	100 cc.
		Glycogène pur (1).....	1 gr.
B	{	Liquide hépatique <i>bouilli</i>	50 cc.
		Na Fl à 3 %.....	100 cc.
		Glycogène (ajouté après refroidissement)	1 gr.

Comme toujours on neutralise exactement l'alcalinité,

(1) Il est absolument indispensable de s'assurer que le glycogène ne réduit pas ; celui livré par le commerce est souvent impur.

due au fluorure, pour ne pas gêner l'action du ferment. Au bout de 12 heures, on constate une réduction intense dans *A* et rien dans *B*.

CONCLUSION. — Cette réduction intense, que nous pouvions prévoir à l'avance d'après les expériences précédentes, prouve l'existence d'un ferment qui a transformé le glycogène en sucre et rien de plus; ce ferment amylolytique est-il une maltase ou une amylase, nous n'en savons rien.

Constatons en passant que la transformation de cet hydrate de carbone en sucre s'est faite d'une façon beaucoup plus rapide que précédemment. (12 heures au lieu de 24). Une autre expérience est nécessaire pour déterminer la nature du sucre obtenu.

**Détermination du sucre
obtenu dans l'expérience précédente.**

EXPÉRIENCE. — Au sortir de l'étuve nous avons constaté qu'un liquide hépatique non bouilli, auquel on avait incorporé du glycogène en présence du fluorure, réduisait abondamment la liqueur de Fehling. Cette substance réductrice, est-elle du maltose ou du glucose ?

Il ne faut pas songer dans le présent cas à faire des osazones, car le liquide contient encore du glycogène, (l'action des ferments n'est jamais complète, il reste toujours de la substance avec laquelle on les a mis en contact).

Or, pour faire ces osazones il faudra employer de l'acide acétique et porter ensuite à l'ébullition ; mais alors le glycogène sera transformé en glucose par cet acide et nous ne pourrions plus interpréter les résultats, car, comment savoir si la glucosazone produite provient du glycogène transformé en glucose par le ferment, ou du glycogène transformé en glucose par l'acide acétique à chaud.

Le problème consiste donc à se débarrasser du glycogène.

Nous avons 2 flacons, *A* non bouilli et *B* bouilli, contenant chacun 145cc. de liquide. Pour se débarrasser du glycogène on se sert de la propriété qu'il a d'être précipité par l'alcool.

On ajoute donc à chaque liquide 3 fois son volume d'alcool à 95°; on porte à l'ébullition, au bain-marie; on filtre à chaud, le glycogène reste sur le filtre.

Le glucose est soluble dans l'alcool, de même que le maltose (1) qui, lui, est surtout soluble à chaud.

(1) JUNGFLEISCH. — *Manipulations de Chimie*, 2^e édit., p. 740.

Ensuite, on s'est débarrassé de l'alcool en évaporant dans de grandes capsules chaque liquide dans un bain-marie. Cette évaporation dure 3 heures; on juge qu'elle est complète quand on a ramené les liquides à leur volume primitif 145 cc.

On filtre et dans les filtrats on va caractériser le maltose et le glucose en les transformant en glucosazone et maltosazone, procédant comme nous l'avons dit dans notre technique.

RÉSULTAT. — *A* et *B* traités par l'acétate de phénylhydrazine sont portés au bain-marie à 100°. Après 5 minutes d'ébullition, on filtre, sur filtre mouillé, pour se débarrasser des produits de résinification; on reporte à l'étuve et au bout d'une heure on laisse refroidir. On constate de nombreux cristaux d'osazone dans *A* et rien dans *B*.

Ces cristaux examinés au microscope présentent l'aspect caractéristique des glucosazones (branche de genêt).

Comme nous sommes partis du glycogène, nous ne pouvons avoir que du maltose, ou du glucose, ou un mélange de ces deux sucres et par conséquent les osazones correspondantes.

A l'aide de l'acétone étendue de son volume d'eau il est facile de séparer ces osazones.

M. GRIMBERT a montré que la maltosazone est soluble dans l'acétone étendue de son volume d'eau et pouvait ainsi être séparée de la glucosazone qui, elle, y était insoluble.

Les osazones de *A* sont recueillies sur un filtre et lavées à l'eau froide; ainsi purifiées elles sont traitées par l'acétone étendue pour dissoudre les maltosazones.

L'osazone restée sur le filtre est insoluble dans l'acétone étendue et dans l'alcool méthylique; ses cristaux caractéris-

tiques en branche de genêt fondent à 230°; on a donc une glucosazone.

Le liquide filtré abandonné à lui-même au contact de l'air laisse déposer de petits cristaux en rosaces ressemblant à des maltosazones, mais en quantité trop faible pour pouvoir en prendre le point de fusion.

La provenance de ces derniers cristaux, leur nature d'être des osazones, leur forme, leur présence avec des glucosazones, permettent de dire que ce sont des maltosazones puisqu'on est parti du glycogène.

Dans cette expérience, comme dans beaucoup d'autres, il nous a été difficile de saisir le stade maltose par lequel passent forcément le glycogène et l'amidon pour arriver à l'état de glucose, terme extrême de leur transformation. Dans d'autres expériences, nous procéderons d'une façon indirecte pour caractériser la maltase.

CONCLUSION. — Les ferments du foie ont donc transformé du glycogène en un mélange de glucose et de maltose; le glucose prédomine de beaucoup.

Le sucre hépatique est-il du glucose ou du maltose ?

EXPÉRIENCE. — Chien de race commune, 3 ans. Bonne santé, pesant 28 kilos. Tué par la section du cou 3 heures après son repas. Foie lavé pesant 552 grammes après hydrotomie; le foie était parfaitement décoloré.

Les 179 cc. de liquide hépatique recueillis sont mis dans un dialyseur en baudruche et ayant subi l'épreuve de la solution d'hémoglobine.

Le dialyseur est placé en dehors du laboratoire (la température était très basse) dans un vase contenant de l'eau fluorée à 2 %; cette eau a été renouvelée toutes les 24 heures pendant 3 jours; tout le liquide est conservé en vue d'y doser le sucre qu'il contient; on obtient ainsi 3 litres, qu'on réduit par évaporation à 140 centimètres cubes.

On en prélève 10 cc. et à l'aide de la liqueur décime de Violette ferrocyanurée on constate qu'ils contiennent 125 milligr. de sucre; donc les 140 centim. cubes en contiennent 1 gr 770, ce qui fait une proportion de 1,27 %, condition très favorable pour faire des osazones. (Il faut des liquides ayant 1 à 2 % de sucre).

On a ajouté au liquide 2 cc. de phénylhydrazine bien pure et 2 cc. d'acide acétique à 50 %; le ballon contenant le liquide ainsi préparé est porté pendant une heure et demie sur le bain-marie bouillant. Ensuite par filtration chaude on filtre, sur un filtre sans pli; une osazone insoluble dans l'eau bouillante est restée sur le filtre, une autre est passée dans le filtrat et a cristallisé par refroidissement.

L'osazone insoluble dans l'eau bouillante était très abondante, l'autre l'était peu.

On a mélangé dans un ballon avec de l'alcool méthylique l'osazone recueillie sur le filtre, on a porté pendant une heure et demie au dessus d'un bain-marie à 90°, on a constaté l'insolubilité de cette osazone, on a enfin filtré sur un filtre sans pli qui a été desséché dans le vide sulfurique. La poudre recueillie examinée au microscope permet de constater l'existence de cristaux en forme de branches de genêt, caractéristiques de la glucosazone. Leur point de fusion instantanée est 229-230°. L'osazone soluble dans H²O bouillante, qui a cristallisé par refroidissement, a ses cristaux en forme de rosaces. Son point de fusion n'a pas été pris, mais c'est évidemment une maltosazone étant donné sa provenance.

CONCLUSION. — La plus grande partie du sucre hépatique est du glucose, l'autre partie est du maltose.

REMARQUE. — Des deux expériences précédentes, il semble donc résulter que dans le foie, nous avons deux ferments :

A. — L'amylase qui transforme l'amidon ou le glycogène en maltose.

B. — La maltase qui transforme le maltose en glucose.

Pouvoir amylolytique.

Durée de sa persistance dans les liquides d'extraction.

**Nature du sucre formé par les
ferments hépatiques agissant sur l'amidon.**

Cette expérience a été faite non pour chercher les ferments que nous connaissions déjà, mais pour voir la durée de leur persistance et aussi pour utiliser le liquide de l'expérience précédente.

EXPÉRIENCE. — Une prise d'essai faite dans le dialyseur de l'expérience précédente montre la persistance du sucre. Nous avons dû par suite de circonstances imprévues nous absenter pendant quelques jours ; nous avons laissé les choses en l'état où elles étaient, en ayant soin de placer notre dialyseur dans un vase contenant de l'eau fluorée à saturation. A notre retour, le liquide dialysé contenant toujours du sucre, on a placé le dialyseur et le vase qui le contenait dans l'étuve à 40° ; l'eau est renouvelée constamment ; elle provient d'un vase situé au dehors de l'étuve, cette eau coule goutte à goutte et s'en va de même. Cette opération a duré 2 jours et lorsqu'on a eu constaté qu'il n'y avait plus de sucre dans notre liquide hépatique il s'était écoulé 12 jours depuis la mort.

On retire de l'étuve et l'on fait les 2 flacons suivants qui y sont reportés, après avoir neutralisé exactement l'acalinité due à Na Fl. :

A	{	Liquide hépatique.....	80 cc.	
		Eau fluorée à saturation.....	50 cc.	
		Empois d'amidon à 4 %.....	50 cc.	soit 2 gr.

B	{	Liquide hépatique <i>bouilli</i>	80 cc.
		Eau fluorée à saturation.	50 cc.
		Empois d'amidon à 4 %.....	50 cc. soit 2 gr.

Au bout de 24 heures on retire de l'étuve, on fait toutes les manipulations nécessaires pour extraire tout le sucre. (Précipitation des albuminoïdes par la chaleur et le sous-acétate de fer, reprise par l'eau bouillante et la presse, etc.).

On constate que dans *B*, il n'y a pas trace de sucre.

Dans *A*, le dosage indique que les 2 grammes d'amidon ont donné 0^{gr} 452 de sucre réducteur. On a aussi déterminé la nature du sucre formé par l'action de ferments agissant (12 jours après leur extraction), sur de l'empois d'amidon. Pour cela, on a fait des osazones et on a constaté que :

1^o Une faible partie était soluble dans l'eau bouillante et cristallisait par refroidissement ;

2^o Une partie beaucoup plus importante restait sur le filtre ; cette partie n'était pas soluble dans l'alcool méthylique.

CONCLUSION. — Un liquide hépatique provenant d'un chien abattu depuis 12 jours a été actif et a transformé 2 grammes d'amidon en un mélange de glucose et de maltose, mélange contenant une très faible quantité de maltose.

Ferment inversif.

EXPÉRIENCE. — Chien mâle, 25 kilos. 10 ans. Foie petit, normal. Malgré un lavage qui a duré une heure et a nécessité 10 litres de solution, le foie, d'un poids de 320 grammes, était peu décoloré. La dialyse chloroformique a permis d'extraire 40 cc. de liquide.

Au bout de 3 jours de dialyse à l'eau fluorée courante et à 40° il n'y avait plus dans le liquide ni sucre ni glycogène, mais le volume primitif avait été augmenté et l'on a retiré du dialyseur 70 cc., soit 30 de plus qu'on n'en avait mis.

On amène à 150 cc. avec de l'eau distillée et l'on prépare les 3 ballons suivants que l'on porte pendant 24 heures à l'étuve à 40°, après avoir ajouté un peu d'acide acétique pour neutraliser l'alcalinité de Na Fl. :

A	{	Liquide hépatique.....	50 cc.
		Saccharose pur.....	50 cg.
		Na Fl à saturation.....	50 cc.
B	{	Liquide hépatique <i>bouilli</i>	50 cc.
		Saccharose pur (ajouté après refroidissement).....	50 cg.
		Na Fl à saturation.....	50 cc.
C	{	Liquide hépatique.....	50 cc.
		Empois d'amidon à 2 %.....	0 ^{gr} 50
		Na Fl à saturation.....	50 cc.

Au sortir de l'étuve on constate dans *C* une réduction très active de la liqueur de Fehling, ce qui prouve l'existence d'un ferment amylolytique plusieurs fois déjà mis en évidence.

A et *B* sont traités comme précédemment pour précipiter toutes les matières albuminoïdes et recueillir tout le sucre réducteur.

RÉSULTAT. — Ni *A* ni *B* ne contiennent de sucre réducteur.

CONCLUSION. — Dans les conditions de l'expérience, le liquide hépatique ne contient pas d'invertine.

Ferment inversif.

EXPÉRIENCE. — Chien 10 ans, à l'abstinence depuis 48 heures, eau à discrétion. Sacrifié par la section du cou. Au bout de 45 minutes, le foie après avoir été traversé par 13 litres d'eau physiologique est découpé, haché et mis à macérer pendant 20 heures dans deux litres d'eau fluorée à 2 %.

Ensuite on filtre sur coton de verre, on prélève 300 cc. de ce liquide que l'on soumet à la dialyse à l'eau courante fluorée à 2 %, jusqu'à disparition certaine du glycogène et du sucre.

On prépare les 3 ballons suivants :

A	{	Liquide de macération	100 cc.
		Saccharose pur	4 gr.
B	{	Liquide de macération <i>bouilli</i>	100 cc.
		Saccharose pur (ajouté après refroidissement)	4 gr.
C	{	Liquide de macération	100 cc.
		Saccharose pur	0 gr.

Après avoir fait les mêmes manipulations que précédemment on constate que *A*, *B*, *C*, ne contiennent pas trace de sucre réducteur.

CONCLUSION. — Le ferment inversif n'existe pas dans le liquide hépatique avec lequel on a opéré.

REMARQUE. — Sur un volume connu prélevé dans chaque ballon on fait un dosage (après ébullition avec H Cl), qui permet de retrouver dans chaque ballon la totalité du sucre incorporé.

Ferment glycolytique.

EXPÉRIENCE. — Chien mâle, 30 kilos. Lavage du foie pendant une heure avec 15 litres de solution physiologique à 7,5 ‰. Foie bien décoloré pesant 235 grammes.

Le chien était à jeun depuis 24 heures au moment où on l'a tué.

Le foie est soumis pendant 48 heures à la dialyse chloroformique, et fournit 200 cc. de liquide.

Ce liquide mis dans un dialyseur est porté à l'étuve à 40° pendant 48 heures: au bout de ce temps de dialyse à l'eau courante et fluorée, on constate que le liquide hépatique ne contient plus ni sucre ni glycogène.

On prépare les 2 flacons suivants qui sont remis 24 heures à l'étuve après que l'on a eu neutralisé exactement le Na Fl:

A	{	Liquide hépatique	90 cc.
		Glucose pure.....	0 gr 50
		Na Fl en poudre.....	0 gr 50
B	{	Liquide hépatique <i>bouilli</i>	90 cc.
		Glucose pure.....	0 gr 50
		Na Fl en poudre.....	0 gr 50

S'il y a un ferment glycolytique on devra trouver, sinon la disparition totale, au moins une réduction notable du glucose dans le flacon non bouilli.

Le contenu des deux flacons au sortir de l'étuve est traité pour extraire tout le sucre; à la suite des diverses manipulations on a amené les liquides provenant de A et de B à un même volume 500 cc.

Après dosage on constate que :

A contient 0,50 de sucre et que *B* en contient également 0,50.

On retrouve exactement le poids du glucose que l'on a mis dans les flacons.

CONCLUSION. — Le liquide de l'expérience ne contenait pas de ferment glycolytique.

**Mise en évidence de la maltase
par la transformation du maltose en glucose.**

EXPÉRIENCE. — On prend 60 cc. d'un liquide hépatique provenant d'un foie hydrotomisé et soumis à la dialyse chloroformique. Ce liquide conservé depuis 2 jours dans une solution fluorée à saturation ne contient plus ni sucre ni glycogène (on s'en est débarrassé par la dialyse).

On fait les deux flacons suivants, qu'on porte à l'étuve pendant 24 heures après avoir neutralisé l'alcalinité du fluorure :

A	{	Liquide hépatique en solution fluorée	30 cc.
		Na Fl à 1 %.....	30 cc.
		Maltose pure.....	1 gr.
B	{	Liquide hépatique en solution fluorée <i>bouilli</i>	30 cc.
		Na Fl à 1 %.....	30 cc.
		Maltose pure.....	1 gr.

Le maltose s'il est modifié par des ferments ne peut l'être qu'en étant amené à l'état de glucose. Au sortir de l'étuve, on porte à l'ébullition pour chasser le chloroforme.

A et *B* traités chacun par l'acétate de phénylhydrazine sont portés au bain-marie à 100°; on filtre au bout de 5 minutes, on remet ensuite au bain-marie à la même température pendant une heure; on constate alors de nombreux cristaux d'osazones dans *A* et rien dans *B*.

Ces osazones recueillies sur un filtre sont lavées d'abord à l'eau froide, ensuite à l'acétone à 50 % d'eau; elles ne sont pas dissoutes; ce qui est retenu sur le filtre, examiné au microscope, est facilement reconnu pour être des cristaux de

glucosazones. grâce à la forme caractéristique en branche de genêt.

Ces cristaux desséchés dans le vide sulfurique fondent à 229-230°, ce sont des glucosazones.

CONCLUSION. — Si le maltose a été transformé en glucose, c'est que le liquide hépatique contient de la maltase.

Recherche de l'amylase et de la maltase.

Transformation du glycogène en maltose et glucose.

Dans plusieurs expériences le liquide hépatique, agissant sur l'empois d'amidon ou le glycogène, transformait ces deux substances en un mélange de glucose et de maltose ; mais ce dernier y était toujours en très petite quantité et il était difficile de pouvoir en prendre le point de fusion.

Le stade maltose était-il rapidement franchi, ou bien au moment de l'examen s'était-il écoulé un temps trop long depuis la mise en œuvre des diastases ; c'est probablement cette dernière éventualité qui s'était produite.

En ne laissant le liquide et le glycogène en contact que pendant 6 heures, on devait retrouver plus facilement le maltose ; c'est ce que l'expérience suivante prouve.

EXPÉRIENCE. — Avec les 70 cc. d'un foie hydrotomisé soumis à l'action des vapeurs de chloroforme et dont le glycogène a été transformé par un séjour de 24 heures à l'étuve, puis le sucre éliminé par la dialyse, on prépare les 2 ballons :

A	{	Liquide hépatique.....	35 cc.
		Eau fluorée à saturation.....	35 cc.
		Glycogène pur.....	1 gr.
B	{	Liquide hépatique <i>bouilli</i>	35 cc.
		Eau fluorée à saturation.....	35 cc.
		Glycogène (ajouté après refroidissement)....	1 gr.

On neutralise avec de la lessive de soude et on porte à l'étuve.

Au bout d'une heure, un prélèvement de quelques

centimètres cubes montre qu'il n'y a aucune réduction ni dans *A* ni dans *B*.

Au bout de 2 heures, très légère réduction dans *A*, rien dans *B*.

Au bout de 3 heures, réduction très nette dans *A* et nulle dans *B*.

Après 6 heures d'étuve, on retire les 2 ballons et on les porte à l'ébullition pour chasser tout le chloroforme, et arrêter l'action des diastases dans *A*.

La liqueur de Gram indique qu'il y a encore beaucoup de glycogène dans les liquides d'expérience, ce qui n'a rien d'étonnant, car l'on sait que dans de pareilles circonstances l'action des ferments n'est jamais complète.

Il faut absolument se débarrasser de ce glycogène, car dans le courant de l'expérience on va ajouter de l'acide acétique et porter à l'ébullition; or, il se formera par ce fait même, du glucose aux dépens du glycogène restant, et à la fin de l'expérience l'interprétation du résultat serait impossible; on ne saurait si c'est le ferment ou l'acide à chaud qui a produit le sucre réducteur?

Chaque ballon est traité de la façon suivante :

On ajoute 210 cc. d'alcool à 95° dans *A* et dans *B* (*3 fois le volume des liquides*), on porte à l'ébullition au bain-marie à 100°; on filtre à chaud, le glycogène reste sur le filtre et le maltose et le glucose, s'ils existent, se trouveront dans le filtrat.

L'alcool est évaporé et dans le liquide qui reste on caractérise à l'aide des osazones les sucres qu'il tient en dissolution.

RÉSULTAT. - *A* et *B* sont additionnés de 2 grammes de phénylhydrazine et de 2 grammes d'acide acétique à 50 %;

on porte au bain-marie bouillant, au bout de 5 minutes, on filtre sur papier mouillé pour se débarrasser des produits de résinification.

On remet au bain-marie à 100° pendant une heure, puis on laisse refroidir complètement.

Il s'est formé des osazones; elles sont recueillies sur un filtre sans pli et lavées à l'eau froide, puis traitées par une petite quantité (25 à 30 cc.) d'acétone étendue de son volume d'eau.

La maltosazone, si elle existe, sera entraînée par ce lavage, car elle est soluble dans l'acétone étendue, tandis que la glucosazone qui y est insoluble restera sur le filtre.

Dans *B*, il n'y a pas trace d'osazone.

Dans *A* on constate qu'une osazone est restée sur le filtre et qu'une autre aussi abondante qui a cristallisé par refroidissement se trouve dans le filtrat.

Le glycogène soumis à l'action des diastases hépatiques étant le générateur de ces phénylosazones, elles sont sûrement soit des maltosazones soit des glucosazones.

Il est facile de les caractériser. Celle restée sur le filtre est insoluble dans l'acétone étendue de son volume d'eau, insoluble dans l'alcool méthylique, et ses cristaux en branches de genêt fondent à 230° — c'est une glucosazone.

L'osazone, qui a cristallisé par refroidissement dans le filtrat, recueillie sur un filtre, donne des cristaux en rosaces qui fondent à 198-200° — c'est une maltosazone.

CONCLUSION. — Au bout de 6 heures un liquide hépatique qui a pu transformer du glycogène en un mélange de glucose et de maltose contient donc de l'amylase et de la maltase.

Ferment protéolytique.

EXPÉRIENCE. — Chien d'un an pesant 35 kilos, nourri depuis 3 jours exclusivement avec de la viande.

Sacrifié par la section du cou, foie hydrotomisé avec 12 litres de la solution physiologique. Au bout de une heure le foie bien décoloré est laissé 24 heures exposé aux vapeurs de chloroforme. Liquide recueilli 80 cc.

Au bout de ce temps, le foie coupé en morceaux, puis haché, est mis à macérer pendant 24 heures dans l'eau fluorée à 3 %; on filtre sur coton de verre.

On a préparé 6 petits cubes de un demi centimètre de côté, prélevés dans de l'albumine d'œuf cuit, et pesé deux fois 2 grammes de fibrine de porc.

Les 2 ballons suivants sont préparés et mis à l'étuve à 40°, après avoir acidifié très légèrement avec quelques gouttes d'acide acétique :

A	{	Liquide hépatique en solution fluorée.....	100 cc.
		Albumine.....	3 cub.
		Fibrine crue.....	2 gr.
B	{	Liquide hépatique en solution fluorée (bouilli).	100 cc.
		Albumine (petits cubes).....	3 cub.
		Fibrine crue (ajoutée après refroidissement).. <td>2 gr.</td>	2 gr.

Les petits cubes d'albumine et la fibrine étaient déposés sur une toile métallique à très larges mailles; on pouvait ainsi examiner plus facilement ce qui se passait.

Au bout de 2 heures, on retire les toiles supportant fibrine et albumine et on constate que la fibrine n'a pas été attaquée et que les angles des cubes d'albumine ne sont même pas émoussés.

On remet à l'étuve, et toutes les deux heures on regarde si la matière albuminoïde est attaquée.

Au bout de 12 heures, les albuminoïdes étaient toujours dans le même état.

CONCLUSION. — Le liquide hépatique ainsi traité n'a aucune action protéolytique.

REMARQUE. — Cette expérience répétée dans les mêmes conditions avec de la fibrine provenant du chien, du mouton, du veau, du bœuf nous a toujours donné des résultats négatifs; dans un cas, on avait acidifié très légèrement avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique.

Isolement des ferments amylolytiques.

Pour extraire ces ferments, on opère sur un liquide hépatique que l'on se procure suivant le procédé employé dans les précédentes expériences.

Ce liquide ne contient plus ni sucre ni glycogène, c'est le même qui nous a servi à mettre en évidence l'existence de la maltase.

On le filtre par la trompe, le filtrat est additionné de 3 fois son volume d'alcool à 95°; le tout est rapidement refiltré, on recueille le précipité, on le dessèche à l'étuve à 40°; l'alcool est ainsi évaporé. C'est, du reste, la méthode générale employée pour la préparation des ferments solubles.

EXPÉRIENCE. — On pulvérise le précipité; avec la poudre obtenue on prépare les 2 ballons suivants, on neutralise l'alcalinité de Na Fl et on porte à l'étuve à 40°.

A	{	Eau fluorée à 3 %.....	50 cc.
		Précipité pulvérisé	1 gr.
		Glycogène.....	1 gr.
B	{	Eau fluorée à 3 % (bouilli)	50 cc.
		Précipité pulvérisé (d°)	1 gr.
		Glycogène.....	1 gr.

D'heure en heure, on fait des prélèvements, et on constate qu'au bout de la 3^{me} heure le liquide de *A* réduit nettement la liqueur de Fehling, tandis que celui de *B* est inactif.

Au bout de 20 heures, réduction intense dans *A*, toujours rien dans *B*. (Bien entendu *A* a été soumis à l'ébullition pour chasser le chloroforme qu'il peut encore contenir, et ce n'est qu'après, que la liqueur cupro-potassique est ajoutée).

Le sucre de *A*, provient donc de l'action d'une substance qui a transformé le glycogène en sucre réducteur; cette substance :

1° Ne dialyse pas (car le liquide d'où elle a été retirée a été prélevé dans un dialyseur);

2° Son activité est détruite par la chaleur;

3° Elle a été obtenue en précipitant par l'alcool ;

4° Son action se manifeste surtout à 40° ;

5° Elle est soluble dans l'eau ;

6° On obtient avec elle des actions diastasiques très nettes.

CONCLUSION. — Cette substance est un ferment soluble, puisqu'elle en possède les propriétés générales.

CHAPITRE V

Recherches sur les ferments endo-cellulaires.

Étude critique des travaux étrangers.

Récemment (1903-1904) parurent en Allemagne une série de travaux, en particulier de STOKLASA et SIMACEK, qui auraient isolé des différents organes, et en particulier du foie un ferment analogue ou identique à la zymase isolée par BÜCHNER dans la levure de bière.

Ce ferment, isolé par des procédés sur lesquels nous allons revenir, serait en effet capable de décomposer *in vitro* le sucre, et produirait de l'alcool et de l'anhydride carbonique.

Lorsqu'on est en présence d'une hexose, le glucose par exemple, la décomposition se produit directement sous l'influence du ferment; mais lorsqu'on est en présence de bioses, tels le saccharose ou le lactose, l'action se produirait en deux phases successives et distinctes; d'abord un ferment soluble hydrolysant transformerait la molécule de biose en deux molécules d'hexoses; ainsi la molécule de lactose serait transformée en une molécule de galactose et une de glucose ce qui ramène au cas précédent.

Les principaux organes, et le foie en particulier, contiendraient donc d'après les auteurs cités de la lactase et de l'invertine en même temps que la zymase dont nous n'avons pas à nous occuper ici.

Si ces ferments avaient passé inaperçus jusqu'à présent, c'est qu'ils sont très fortement inclus à l'intérieur de la cellule, et qu'il faut de très puissants moyens d'action pour les dégager. Voici le procédé auquel STOCKLASA et SIMACEK se sont définitivement arrêtés.

L'organe prélevé aussitôt après la mort de l'animal, est finement haché, puis broyé avec du sable, de manière à obtenir une pâte de consistance assez ferme. Cette pâte est mise dans une toile résistante, et soumise à l'action progressive et lente d'une presse hydraulique, de manière à obtenir une pression de 300 atmosphères par centimètre carré. Dans ces conditions, les cellules comprimées et pénétrées par les particules siliceuses, laissent sourdre les ferments que nous venons d'énumérer et qui n'avaient pu être isolés par les anciens moyens.

Ce liquide précipité par deux volumes d'un mélange en parties égales d'alcool à 95° et d'éther, fournit un précipité volumineux, qu'on sépare rapidement au moyen de la force centrifuge. Ce précipité est redélayé dans un volume d'éther égal à celui précédemment employé.

L'action de la force centrifuge permet de séparer de nouveau le précipité qui est essoré au moyen de la trompe et mis à sécher dans le vide sur l'acide sulfurique.

Ce précipité incorporé à une solution sucrée produirait une fermentation énergique. Cette zymase serait très fragile, elle agirait mal en présence des antiseptiques, et se détruirait spontanément en l'espace d'une quinzaine de jours.

Les recherches précédentes présentent un intérêt considérable au point de vue de la physiologie générale, car les auteurs qui se sont occupés de cette question ont la prétention d'identifier une des phases de la consommation du glucose dans l'organisme avec les phénomènes de la fermenta-

tation alcoolique ; ils en ont même déduit des conséquences au point de vue de la pathogénie du diabète. C'est ainsi que l'un d'eux n'aurait pu isoler cette zymase du foie d'un diabétique ; tandis qu'on la trouve facilement dans le foie d'individus morts accidentellement, par conséquent ayant un foie normal.

L'intérêt qui s'attache à ces questions devait inciter les expérimentateurs à reproduire les expériences de STOKLASA et SIMACEK ; d'autant plus que la lecture attentive de leurs mémoires, pouvait faire naître un doute sur l'intervention des bactéries dans les phénomènes qui nous occupent.

A la vérité, les auteurs insistent à plusieurs reprises sur les précautions qu'ils n'ont pas manqué de prendre, pour se mettre à l'abri de cette cause d'erreur. Les moyens qu'ils ont employés (addition de toluol, de chloroforme, etc., à leur liqueur, ou emploi de solution à 30 % de sucre de saccharose) n'éliminaient pas avec certitude l'action possible des microbes.

M. C. RICHTER reprenant récemment cette question, a montré quelle était la résistance des ferments lactiques aux antiseptiques (1).

Il paraît fort possible que ce ferment lactique contamine les liquides d'expériences, étant donné sa profusion dans la nature ; il existe partout, et le fait de l'acidification (du liquide d'expérience) observé par tous les auteurs qui se sont occupés de la question, en est une preuve.

D'ailleurs, l'aveu implicite de cette contamination des liquides existe dans maints endroits des mémoires qu'on trouvera cités à la Bibliographie.

(1) C. RICHTER. — Étude sur la fermentation lactique. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1904, p. 216.

Une singulière méconnaissance de la biologie des bactéries, révélée par certaines phrases des auteurs précédents et en particulier de SIMACEK, jette un doute sur l'ensemble du travail.

C'est ainsi que SIMACEK, après avoir constaté l'envahissement par les bactéries d'un liquide d'expérience, prélève 5 cc. de ce liquide, les incorpore à une solution à 10 % de saccharose. Il voit, en effet, que ces bactéries sont capables de détruire le saccharose et de produire de l'alcool et de l'acide carbonique. Mais, à la vérité, la quantité de sucre détruite et celle d'alcool formé sont inférieures aux mêmes substances détruites et formées dans le flacon d'expérience.

SIMACEK a la prétention de tirer la conclusion suivante de cette recherche :

Dans le flacon d'expérience, nous dit-il, se sont produites d'une façon concomitante deux actions, l'une due à la zymase, l'autre aux bactéries. Le second flacon préparé en ensemençant la solution de saccharose avec 5 centimètres cubes du liquide expérience, va permettre d'attribuer aux ferments solubles et aux bactéries, la part qui revient à chacun d'eux.

Cette prétention paraîtra absolument insoutenable à tous les biologistes qui savent bien qu'en changeant les conditions de milieu (ici en fournissant aux bactéries un milieu très pauvre en matières azotées relativement au premier), on les met dans des conditions moins favorables pour détruire le sucre et produire de l'alcool et de l'acide carbonique.

Etant donné cette façon de procéder, comment et dans quelles conditions les auteurs précédents, ont-ils fait les cultures qui leur permettent d'affirmer la stérilité de leurs liquides d'expérience, dans d'autres cas, où la fermentation a été observée ?

La vérification des expériences précédentes, entreprise d'une part par CONHEIM en Allemagne et d'autre part par BATELLI, n'a pas permis de confirmer l'existence d'une diastase alcoolique dans les tissus des animaux supérieurs. En laissant de côté les expériences de CONHEIM pour la partie qui a trait au rôle du pancréas dans la glycolyse, nous constatons que cet auteur ainsi que BATELLI arrivent à la conclusion que les phénomènes observés sont dus à l'intervention de bactéries se développant dans les liquides d'expérience abandonnés pendant un temps très long à la température de 40 degrés en présence d'antiseptiques insuffisants (1).

Récemment PORTIER a repris ces expériences. Il a constaté qu'en présence d'antiseptiques qui présentent toute sécurité, comme le Na Fl à 2 p. 100, on n'observe aucune disparition du sucre. D'autre part, il a vu qu'en réalisant toutes les conditions considérées par STOKLASA et SIMACEK comme les plus favorables pour la préparation et l'action de la zymase, et en opérant sans antiseptique pendant une durée de deux à trois heures à la température de 30 ou 37 degrés, on n'observe la plupart du temps aucune disparition du glucose de la solution. Dans d'autres cas, une très faible quantité est consommée (quelques centigrammes), avec formation de quantités d'alcool ne dépassant pas quelques milligrammes, faits qui s'expliquent parfaitement par le développement abondant des bactéries dans ces conditions d'expérience. Mais dans aucun cas, PORTIER n'a pu réaliser cette fermentation instantanée et si intense, qu'elle s'accompagne de la formation d'écume à la surface du liquide (STOKLASA et SIMACEK).

Il semble donc bien que la question soit définitivement

(1) Les flacons étaient abandonnés 10 jours et plus à l'étuve.

jugée et que le fait, si intéressant, découvert par les deux derniers auteurs ne soit dû qu'à une erreur d'expérience provenant de la contamination des liquides sur lesquels on expérimente.

Cependant, étant donné l'importance de la question, et considérant l'insistance avec laquelle les auteurs autrichiens maintiennent leurs conclusions, nous avons désiré nous faire une opinion personnelle sur ce sujet, en nous plaçant à un point de vue particulier que nous allons exposer.

Nous avons vu que d'après les auteurs précédents, SIMACEK en particulier, la fermentation des bioses (saccharose, lactose) sous l'influence de la zymase des tissus s'opérerait en deux temps : 1^o dédoublement et hydrolyse ; 2^o fermentation proprement dite des hexoses formées ; c'est d'ailleurs le mécanisme admis pour la fermentation alcoolique du *sacchoromyces*.

De ces deux stades, laissons de côté le second. Admettons que cette zymase soit un ferment si fragile qu'il ne puisse agir en présence d'antiseptiques, et qu'il se détruise spontanément en l'espace d'une douzaine de jours ; toutes ces conditions rendent sa constatation certaine particulièrement délicate.

Mais, à côté de lui, dans le précipité obtenu en traitant le suc de « presse » de foie par le mélange alcool-éther, nous devons trouver l'invertine et la lactase. Nous connaissons ces ferments, nous savons qu'ils se conservent longtemps à l'état sec et à l'abri de la lumière ; nous savons qu'il est facile de constater leur action en éliminant avec certitude les bactéries, au moyen du fluorure de sodium à 2 p. 100.

Prenons donc du précipité datant de plus de 15 jours ; la zymase n'y existera plus ou tout au moins sera fort peu active ; tandis que l'invertine et la lactase pourront être facilement mises en évidence.

Telle est l'expérience que nous avons conçue; nous allons maintenant exposer le détail de sa réalisation.

Du foie de bœuf (880 grammes), pris aussitôt après la mort de l'animal, est haché, broyé avec du sable siliceux, lavé, enfermé dans une toile résistante et soumis à une pression progressive et lente dans une presse hydraulique. Le liquide qui s'écoule pendant que la pression varie de 0 à 75 kilos par centimètre carré n'est pas utilisé, puisque, d'après STOKLASA, il contiendrait peu de ferments. On recueille le liquide sirupeux et assez fortement coloré qui s'écoule pendant que la pression progresse de 75 à 390 kilog. par centimètre carré; on obtient ainsi 163 cc. de liquide. On verse ce liquide dans un mélange à parties égales d'alcool à 90° et d'éther (330 cc. de chacun). Le précipité qui se forme est recueilli rapidement au moyen de la centrifuge, redélayé dans 660 cc. d'éther et de nouveau rapidement séparé au moyen de la centrifuge, puis comprimé entre quelques feuilles de papier buvard. Il est alors placé dans le vide sec. Il ne s'est pas écoulé plus d'un quart d'heure depuis le moment de la précipitation par l'alcool éther jusqu'au moment où le précipité a été placé dans le vide sec.

On voit donc qu'on réalise, dans les meilleures conditions, les prescriptions formulées par STOKLASA et SIMACEK.

La poudre obtenue est d'abord en partie utilisée pour la recherche de la zymase (expériences de PORTIER, d'ailleurs négatives), puis pour la recherche de l'invertine, de la lactase, de l'amylase, de la maltase et de l'inulase.

**Expériences préliminaires
faites sur des solutions de lactase et d'invertine
en contact avec la poudre du foie.**

Notre poudre contient du sucre et du glycogène (nous l'avons constaté en dissolvant une petite quantité de poudre et traitant la dissolution par les liqueurs de GRAM et de FEHLING) nous voudrions nous débarrasser de ces deux substances sans toucher aux ferments qui nous intéressent. Pour cela, nous mettons une certaine quantité de cette poudre dans une solution de Na Fl à saturation, nous portons le tout pendant 48 heures à l'étuve à 40°; pendant ce temps, tout le glycogène sera transformé, ce dont nous nous assurerons à l'aide de la liqueur de GRAM. On se débarrassera ensuite facilement du sucre formé par la dialyse à l'eau courante et fluorée; alors on recherchera beaucoup plus facilement les ferments que nous proposons d'étudier: amylase, maltase, invertine, lactase et inulase.

Répondons par avance à une objection qui pourrait nous être faite, à savoir que les ferments, s'ils existaient, ont pu disparaître par la dialyse. Nous pourrions, *a priori*, réfuter cette objection en nous retranchant derrière le travail de NIKITA CHOSDAJEN (1) qui a démontré que les ferments dialysent très peu et avec une extrême lenteur.

Dans une première expérience préliminaire nous vérifierons que non seulement la dialyse n'entraîne pas les diastases, mais qu'elles ne sont détruites ni par la durée de l'expérience, ni par les diverses substances que contient la

(1) N. CHOSDAJEN. — « Les Enzymes sont-elles dialysables ? » *Archives de Physiologie*, 1898, page 141.

poudre, ni par le ferment protéolytique signalé dans le foie par certains expérimentateurs (1).

Pour cela dans une dissolution fluorée de poudre nous ajoutons une certaine quantité de liquide provenant d'une macération fluorée d'intestin grêle d'un fœtus de vache à terme (2). Cette macération contient de l'invertine et de la lactase ; si après passage à l'étuve (pour transformer tout le glycogène) et après dialyse (pour éliminer tout le sucre qui pourrait gêner pour l'interprétation des résultats) nous caractérisons ces deux enzymes, nous aurons fait la preuve de leur persistance.

Nous allons successivement démontrer :

1^o Que notre macération est active ;

2^o Que les ferments que contient cette macération persistent pendant tout le temps que dure l'expérience ;

3^o Que ces ferments ne dialysent pas et que la poudre de foie n'a pas d'action destructive sur eux.

(1) Dans les expériences antérieures, nous avons pendant longtemps cherché ce ferment ; nos recherches ont toujours été vaines.

(2) Après avoir débarrassé l'intestin de son mésentère et des parties graisseuses, on l'incise sur toute sa longueur à l'aide de l'entérotome ; on le met dans une passoire au-dessous d'un robinet d'eau, on filtre sur coton de verre. Le hachis ainsi nettoyé est mis à macérer pendant 24 heures dans une solution fluorée à 2 %. Le lendemain, on recueille le liquide par filtration. On obtient ainsi des liquides très actifs.

Démonstration prouvant que l'intestin dont on se sert contient de l'invertine et de la lactase.

EXPÉRIENCE. — Nous nous assurons que notre liquide de macération ne contient ni sucre ni glycogène; c'est assez le cas général, mais la constatation doit être faite.

On prépare les 4 ballons suivants, qui sont portés pendant 24 heures à l'étuve, après avoir neutralisé par l'acide acétique l'alcalinité due au fluorure (les ferments agissant mal en milieu alcalin.)

A	{	Liquide de macération intestinale fluoré à saturation.....	50 cc.
		Saccharose pur (1).....	0 ^{gr} 50
B	{	Liquide de macération intestinale fluoré à saturation..... (Bouilli).	50 cc.
		Saccharose pur (ajouté après refroidissement).....	0 ^{gr} 50
<i>a</i>	{	Liquide de macération intestinale fluoré à saturation.....	50 cc.
		Lactose pure.....	0 ^{gr} 50
<i>b</i>	{	Liquide de macération intestinale fluoré à saturation..... (Bouilli).	50 cc.
		Lactose pure.....	0 ^{gr} 50

a et *b* sont déféqués par le nitrate mercurique; (2) on neutralise ensuite exactement avec la lessive de soude,

(1) Il est indispensable de bien vérifier la pureté du saccharose, il contient souvent un peu de glucose; nous avons eu l'occasion de le constater notamment dans une expérience où nous avons eu la fausse joie de croire, grâce à une réduction abondante, avoir mis en évidence l'invertine que nous cherchions depuis fort longtemps dans le foie. Le flacon témoin nous a enlevé notre illusion. Dans ces sortes d'expériences, un témoin est indispensable; sans lui, une expérience est toujours contestable.

(2) PORTIER et BIERRY. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 15 novembre 1902.

(précaution très importante) on se débarrasse de l'excès de mercure par l'acétate de phénylhydrazine. On porte au bain-marie bouillant pendant une heure. Dans le ballon *a*, la présence de cristaux de glucosazones et de galactosazones insolubles dans l'eau bouillante, dans l'acétone étendue de son volume d'eau, dans l'alcool méthylique même bouillant, montre que la macération est très riche en lactase. Dans le ballon témoin *b*, il n'y a que de la lactosazone facilement caractérisée surtout par sa solubilité dans l'eau bouillante et son point de fusion 214° (1).

Pour *A* et *B* la méthode des osazones n'est pas applicable, car l'ébullition seule, surtout en milieu acétique, suffit à dédoubler le saccharose. La défécation a été faite par l'acétate neutre de plomb ; après filtration, on s'est débarrassé de l'excès de plomb par le sulfate de soude. Ces deux ballons ont été traités de la même façon (même quantité d'acétate de plomb et de sulfate de soude). Dans les filtrats on a prélevé des quantités égales de liquide.

Ces prélèvements, additionnés d'un volume égal de liqueur de Fehling, sont portés en même temps dans des tubes à l'étuve à 80° ; au bout de 5 minutes on voit une réduction abondante dans *A* et rien dans *B* ; ce qui prouve l'existence de l'invertine.

RÉSULTAT. — Nous voilà donc en possession d'une macération renfermant de l'invertine et de la lactase.

(1) BERRY. — Recherche et dosage du lactose en présence du glucose, dans les urines. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 4 avril 1903, tome LV, page 476.

**Persistance de l'invertine et de la lactase,
au bout de 5 jours,
dans la macération intestinale fluorée.**

EXPÉRIENCE. — Il faut, pour nous mettre à l'abri de toute critique, avant de prouver que les ferments ne dialysent pas, prouver qu'ils existaient encore, car notre macération étant préparée depuis 5 jours, on ne manquerait pas de nous dire : si les ferments n'ont pas dialysé, c'est qu'ils n'existaient plus.

Avec 50 cc. de liquide de la macération de l'expérience précédente, après avoir neutralisé exactement, on prépare les flacons suivants :

A	{	Macération intestinale fluorée à saturation...	25 cc.
	}	Saccharose pur	0 50
B	{	Macération intestinale fluorée (<i>bouillie</i>).....	25 cc.
	}	Saccharose pur (ajouté après refroidissement).	0 50

RÉSULTAT. — Après 24 heures d'étuve on examine ; on constate, en procédant comme il a déjà été dit, une abondante réduction avec *A* et rien avec *B*, ce qui prouve l'existence de l'invertine.

Possédant peu de liquide nous n'avons pas fait la constatation de la lactase, mais il est évident que nous serions arrivé à un résultat identique.

La sucrase et la lactase ne dialysent pas.
Elles ne sont pas détruites
par les substances diverses que contient la poudre
provenant du foie comprimé.

EXPÉRIENCE (faite en même temps que la précédente). — Il est évident que si à un liquide contenant des ferments et mis dans un dialyseur on ajoute une substance (ici c'est de la poudre de foie) et que l'on retrouve ces ferments après la dialyse, c'est que ni cette opération ni la substance n'auront détruit les ferments.

Employons notre macération, nous sommes sûr qu'elle possède des ferments; de plus, qu'ils sont restés actifs. Si enfin, dans le liquide dialysé, nous ne retrouvons pas ces diastases ce sera encore une preuve qu'elles n'ont pas été entraînées.

Nous avons soumis à la dialyse, à l'eau courante fluorée, deux grammes de poudre incorporée à une solution fluorée à saturation; après élimination complète du sucre, ce que nous avons constaté à l'aide d'une prise d'essai faite directement dans le dialyseur, on recueille 100 cc. de liquide.

Ces 100 cc. ainsi obtenus sont additionnés de 100 cc. de solution fluorée à 3 % et répartis en 4 lots mis pendant 48 heures à l'étuve à 40°. Comme toujours on opère en milieu neutre.

LACTOSE. . .	{	A	{	Liquide fluoré.....	50 cc.
			}	Lactose.....	0 50
	{	B	{	Liquide..... (Bouilli).	50 cc.
			}	Lactose.....	0 50

SACCHAROSE .	{	a {	Liquide.....	50 cc.
			Saccharose.....	0 50
	{	b {	Liquide..... (<i>Bouilli</i>)..	50 cc.
			Saccharose (ajouté après refroidissement).	0 50

Traités comme il a été dit (osazones pour *A* et *B*, liqueur de Fehling pour *a* et *b*, on constate la persistance de la lactase dans *A*, et celle de l'invertine dans *a*.

Recherche des ferments dans le liquide dialysé.

EXPÉRIENCE. — Cette recherche a été négative. Pour éviter des redites, nous ne décrivons pas les détails de l'opération qui se devinent : évaporation à 40° du liquide pour réduire son volume, recherche des diastases en essayant de transformer du saccharose ou du lactose, etc.

RÉSUMÉ. — Nous avons donc démontré :

1° Qu'une solution de lactase et d'invertine faite depuis 5 jours est restée active ;

2° Que l'invertine et la lactase ne dialysent pas en quantité appréciable ;

3° Que ces ferments n'ont été détruits ni par le temps ni par la poudre de foie.

CHAPITRE VI

Recherches des ferments dans la poudre de foie.

Ferment amylolytique.

EXPÉRIENCE. — 2 grammes de poudre sont mis dans un ballon contenant 150 cc. d'eau fluorée à 3 %, on porte à l'étuve ; au bout de 24 heures on constate qu'il n'y a plus de glycogène.

Tout le contenu du ballon, poudre et liquide, est mis dans un dialyseur en baudruche préalablement essayé ; on dialyse à l'eau courante fluorée pendant 3 jours ; on s'assure alors par une prise d'essai qu'il n'y a plus de sucre dans le liquide.

Au sortir du dialyseur, on fait avec son contenu deux lots contenant chacun la moitié du liquide et de la poudre, et on remet à l'étuve à 40°.

A	{	Liquide + poudre	50 cc.
		Eau fluorée à 3 %.....	50 cc.
		Solution d'empois d'amidon à 2 %.....	50 cc.
B	{	Liquide + poudre (Bouilli).	50 cc.
		Eau fluorée à 3 %.....	50 cc.
		Solution d'empois d'amidon à 2 %.....	50 cc.

Au bout de 24 heures, 5 cc. sont prélevés dans chaque ballon et traités par la même quantité de liqueur de Fehling (2 cc.), on constate une réduction peu abondante, mais très

nette dans *A* et rien dans *B*. — Le ferment amylolytique a donc déjà manifesté son action.

On laisse encore pendant 24 heures à l'étuve et on fait de nouveau un prélèvement de 5 cc. La réduction est très abondante dans *A* et toujours nulle dans *B*.

CONCLUSION. — On peut affirmer qu'il y a dans la poudre de foie un ferment amylolytique transformant de l'empois d'amidon en sucre réducteur, mais on ne peut rien dire de plus.

Dans l'expérience suivante on cherchera si c'est une maltase ou une amylase.

la plus grande partie est de la glucosazone, et une très faible partie seulement de la maltosazone.

L'empois d'amidon a été transformé en un mélange de glucose et de maltose, le glucose prédominant de beaucoup.

CONCLUSION. — La poudre de foie contient donc deux ferments : la maltase et l'amylase.

Recherche de l'invertine.

EXPÉRIENCE. — Dans un ballon contenant 150 cc. d'eau fluorée à 2 %, on ajoute 6 grammes de poudre. Le ballon bouché, est porté pendant 24 heures à l'étuve à 40°, pour transformer le glycogène en sucre. (Cette transformation s'opérera certainement puisque l'expérience précédente nous a démontré l'existence d'un ferment amylolytique.

Au bout de 24 heures, une prise d'essai nous montre qu'il n'y a plus de glycogène.

Tout le contenu du ballon (liquide et poudre) est mis dans un dialyseur en baudruche, préalablement essayé à l'aide d'une solution d'hémoglobine.

On dialyse à l'eau courante fluorée à 1 %; il a fallu 4 jours pour se débarrasser de tout le sucre. (On s'assure de la disparition complète du sucre, en prélevant 5 cc. de liquide dans le dialyseur.)

Après dialyse on recueille dans un verre à expérience, 180 cc. d'un mélange d'eau fluorée et de poudre, on complète à 200 cc. et on prépare les 2 flacons suivants qui sont portés à l'étuve :

A	{	Eau fluorée contenant la poudre débarrassée de sucre et de glycogène.	100 cc.
		Na Fl pulvérisé.	1 gr.
		Saccharose pur.	1 gr.
B	{	Eau fluorée (contenant la même quantité de poudre) débarrassée de sucre et de glycogène. (<i>Bouillie</i>).	100 cc.
		Na Fl pulvérisé.	1 gr.
		Saccharose pur (ajouté après refroidissement).	1 gr.

On neutralise exactement par quelques gouttes d'acide acétique l'alcalinité due à Na Fl, on porte le tout à l'étuve ;

au bout d'une heure, on constate que le milieu est toujours neutre. Cette constatation est faite à nouveau le lendemain.

Au bout de 24 heures, une prise d'essai indique qu'il n'y a pas trace d'inversion.

On remet à l'étuve 24 heures de plus. Enfin, au bout de 48 heures, on procède à l'examen du liquide, après s'être encore assuré de la persistance de la neutralité, et cela pour être bien certain que, s'il y a des ferments, ils se sont toujours trouvés dans un milieu de réaction favorable.

Chaque flacon est traité de la même façon. On a d'abord filtré, le filtrat défecté par l'acétate de plomb (15 cc.); on refiltre, on se débarrasse de l'excès de plomb par le sulfate de soude (3 gr.); enfin, pour avoir un liquide bien clair, on filtre une dernière fois.

On a donc finalement deux liquides provenant l'un de *A* et l'autre de *B*.

S'il y a eu inversion, il y aura dans le liquide provenant de *A* (portion non bouillie), un mélange de glucose et de lévulose qui réduira fortement la liqueur de Fehling. On ne devra avoir aucune réduction dans le témoin *B*.

RÉSULTAT. — Dans deux grands tubes à essai, on met la même quantité de liquide, additionnée du même volume de liqueur de Fehling (3 parties de liquide pour 1 de liqueur); on porte au bain-marie à 80° pendant 10 minutes — il n'y a pas trace de réduction ni dans un tube ni dans l'autre (1).

CONCLUSION. — La poudre de foie ne contient pas d'invertine.

(1) Pour bien montrer que le saccharose existe toujours dans nos liquides, on fait un prélèvement d'un volume connu dans chaque ballon; on porte à l'ébullition avec un peu d'HCl, il y a inversion; un dosage permet de retrouver le sucre incorporé à chacun des liquides.

REMARQUE. — Nous jugeons inutile, pour ne pas fatiguer le lecteur, de décrire deux autres expériences semblables dans tous les détails et surtout semblables comme résultat.

Comme antiseptique au moment de mettre à l'étuve après incorporation du saccharose dans l'une, nous avons ajouté du thymol (1 gramme); dans l'autre, nous avons remplacé le fluorure pulvérisé par une solution à saturation.

Recherche de la lactase.

EXPÉRIENCE. — Dans un ballon contenant 150 cc. d'eau fluorée à 2 %, on ajoute 4 grammes de poudre de foie.

Le ballon est porté à l'étuve à 40° pendant 24 heures pour transformer le glycogène en sucre. Les deux expériences précédentes nous montrent, l'une que le glycogène sera transformé et l'autre que 24 heures suffiront, étant donné que les quatre grammes mis en œuvre dans cette expérience ont la même provenance.

La prise d'essai faite 24 heures après la mise à l'étuve prouve qu'il n'y a plus de glycogène.

Le contenu du ballon est mis ensuite dans un dialyseur essayé comme d'habitude avec la solution d'hémoglobine.

Au bout de 75 heures de dialyse à l'eau courante fluorée, un prélèvement de 5 cc. indique que tout le sucre a dialysé.

On retire du dialyseur 160 cc. d'un mélange d'eau fluorée et de poudre; on complète à 200 cc. et les deux flacons suivants, après neutralisation par la lessive de soude sont portés à l'étuve à 40° pendant 24 heures :

A	{	Eau fluorée contenant la poudre débarrassée de glycogène et de sucre.....	100 cc.
		Na Fl pulvérisé.....	4 gr.
		Lactose pure.....	4 gr.
B	{	Eau fluorée contenant la poudre débarrassée de glycogène et de sucre.....	100 cc.
		Na Fl pulvérisé.....	4 gr.
		Lactose pure.....	4 gr.

Au sortir de l'étuve, on constate que l'on est toujours en milieu neutre.

S'il y a de la lactase, la molécule de lactose sera après hydrolisation dédoublée en deux molécules : l'une de glucose, et l'autre, de galactose.

Pour mettre en évidence avec certitude ces deux sucres, on fera les osazones correspondantes.

Dans le flacon *A* (non bouilli) si la lactase existe, on devra trouver un mélange de glucosazone, de galactosazone et comme l'action des ferments n'est jamais complète, il y aura aussi de la lactosazone.

Dans *B* (bouilli), on ne trouvera que de la lactosazone.

Ceci dit, on défèque *A* et *B* par la même quantité d'azotate mercurique, on traite ensuite par H^2S et on débarrasse de l'excès de H^2S , comme il est dit à la technique.

Aux liquides ainsi obtenus, on ajoute 4 cc. d'acétate de phénylhydrazine, on porte une heure au bain-marie bouillant, on constate qu'il ne se forme pas d'osazones insolubles dans l'eau bouillante, preuve déjà de la non présence de la lactase, car si elle existait, le glucose qu'elle aurait produit donnerait une glucosazone insoluble dans l'eau bouillante.

En fait, après refroidissement dans les deux ballons *A* et *B*, on ne peut caractériser que la lactosazone : (solubilité dans H^2O bouillante, cristaux en oursin ; point de fusion instantanée 214°).

CONCLUSION. — Il n'y a pas de lactase dans la poudre de foie.

Recherche de l'inulase.

Il n'était guère tentant de rechercher l'inulase, après les tentatives infructueuses de MM. BERRY et PORTIER (1), qui ont d'abord recherché en vain cette diastase sur le foie du chien, du lapin et du phoque nourris normalement.

Puis, ces expérimentateurs s'étaient placés dans les meilleures conditions pour mettre l'inulase en évidence ; ils nourrissaient des lapins et des chiens exclusivement avec des topinambours, et ensuite recherchaient l'inuline dans le foie de ces animaux.

On sait que ces tubercules contiennent beaucoup d'inuline, dont la digestibilité et surtout l'assimilation ne sont possibles qu'après hydrolisation de la molécule d'inuline qui est ainsi transformée en lévulose.

Si l'inulase existait dans le foie, on devait, pensaient-ils, la trouver plus facilement dans ces circonstances.

Nous avons essayé de trouver ce ferment dans la poudre de foie.

EXPÉRIENCE. — Dans un ballon, contenant 100 cc. d'eau fluorée à 2 %, on met 2 grammes de poudre ; le tout est porté à 40° pendant 24 heures pour que le glycogène se transforme en sucre.

Au sortir de l'étuve, le contenu du ballon est placé dans un dialyseur en baudruche et soumis à la dialyse à l'eau courante fluorée à 1 %. Au bout de 3 jours, une prise d'essai de quelques centimètres cubes indique que le liquide ne contient plus de sucre.

(1) BERRY et PORTIER. — *Bulletin de la Soc. de Biologie*, 7 mai 1900.

Les 100 cc. d'eau fluorée contenant la poudre, retirés du dialyseur, sont additionnés de 50 cc. d'une solution fluorée à saturation pour augmenter le titre de l'antiseptique et l'amener à 2 %; dans ces conditions, l'action des bactéries est impossible.

Les 2 flacons suivants sont préparés et portés à l'étuve à 40° :

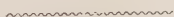
A	{	Eau fluorée + poudre.....	75 cc.
		Inuline pure.....	1 gr.
B	{	Eau fluorée + poudre..... (<i>Bouillie</i>).	75 cc.
		Inuline pure (ajoutée après refroidissement).. <td>1 gr.</td>	1 gr.

Au sortir de l'étuve, on acidifie les 2 ballons avec l'acide acétique, on chauffe à 60-70° pour coaguler les albuminoïdes. Il est indispensable de ne pas dépasser cette température, on pourrait, par le simple fait de la chaleur, transformer l'inuline en glucose; et, dans l'interprétation des résultats, on commettrait une erreur, ou plutôt on ne pourrait pas conclure car on trouverait aussi du glucose dans le flacon bouilli.

Après avoir coagulé les albumines, on filtre; dans 3 parties du filtrat, on ajoute 1 partie de liqueur de Fehling et on porte pendant 5 minutes à l'étuve à 65°.

Aucune réduction ni dans *A* ni dans *B*.

CONCLUSION. — La poudre de foie ne contient pas d'inulase.



CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I. — Le tissu du foie lavé à fond avec une solution isotonique permet d'extraire par un certain traitement des ferments produisant l'hydrolise de l'amidon et du glycogène.

II. — Les sucres qui prennent naissance, sont de la glucose et de la maltose, ce qui prouve l'existence de deux ferments : l'amylase et la maltase.

III. — Les moyens d'action qui nous ont permis de mettre en évidence les deux ferments précédents, nous ont fait constater l'absence, dans le tissu hépatique, de l'invertine, et du ferment glycolytique.

IV. — Il nous a été impossible de mettre en évidence dans le foie, un ferment protéolytique agissant sur la fibrine crue ou l'ovalbumine cuite.

V. — En employant de très puissants moyens d'action (méthode de BÜCHNER), nous n'avons pas réussi à trouver dans le foie, les ferments endo-cellulaires qui avaient été récemment signalés à l'étranger.

Nous croyons donc que les actions supposées de l'invertine et de la lactase observées par STOKLASA et ŠIMÁČEK étaient dues à l'action des bactéries.

VI. — L'étude de ces sucs de « presse » nous a également montré qu'ils ne contiennent pas d'inulase.

VII. — Ces sucs de « presse » contiennent en abondance de l'amylase et de la maltase.

VIII. — Nous avons incidemment constaté à nouveau au cours de ces recherches que l'invertine et la lactase ne dialysaient pas.

VU : *Le Président de thèse,*

GILBERT.

VU : *Le Doyen,*

DEBOVE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.



BIBLIOGRAPHIE

- CLAUDE BERNARD. — Liquides de l'organisme. T. II, p. 210.
— — Diabète, p. 181, 300, 568.
- RAPHAEL DUBOIS. — Leçons de physiologie générale et comparée. — 1898.
— — Anesthésie physiologique et ses applications.
- DASTRE. — Physiologie comparée du foie. 1904.
- GILBERT ET CARNOT. — Les fonctions hépatiques.
- DUCLAUX. — Chimie biologique. T. II.
- BOURQUELOT. — Les ferments solubles.
- VICTOR HENRI. — Lois générales de l'action des diastases. Thèse de Paris, 1903.
- ARTHUS. — Éléments de chimie physiologique.
- TEBB, CHRISTINE. — Hydrolysis of glycogen. *Journ. of physiol.* 22, 423, 432.
- STOKLASA (D^r JULIUS). — Der anaërobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehungen zur alkoholischen Gährung. *Hofmeisters Beiträge*. Bd. III. Heft 11 u. 12. — 1902.
- STOKLASA (D^r JULIUS) unter Mitwirkung des Assistenten CZERNY. — Ueber die anaërobe Athmung der Thierorgane und über die Isolierung eines gährungserregenden Enzyms aus dem Thierorganismus. *Centralblatt für Physiologie* XVI, 1903, S. 652. — 1903.
- STOKLASA (D^r JULIUS). — Beiträge zur Kenntniss der aus der Zelle höher organisierter Tiere isolierten, gährungserregenden Enzyme. *Centralblatt für Physiologie* XVII, 1903, S. 465. — 1903.
- STOKLASA (D^r JULIUS) et CZERNY (F.). — Beiträge zur Kenntniss der aus der Zelle höher organisirter Thiere isolierten, gährungserregenden Enzyme. *Berichte der Deutsch. Chemisch. Gesellschaft* 1903, 63, S. 4058.
- ARNHEIM (D^r JULIUS) und ROSEMBAUM (D^r ADOLF). — Ein Beitrag zur Frage der Zuckerstörung im Tierkörper durch Fermentwirkung (glykolyse). *Hoppe-Seyler's Zeitschrift*. XL. 1903. S. 220-233. — 1903.
- BLUMENTHAL. — Ueber das glykolytische Ferment. *Deutsche med. Wochenschrift* 1903, 51. S. 961. — 1903.
- HIRSCH (R.). — Ueber die glykolytische Wirkung der Leber. *Hofmeisters Beiträge* IV, 1903, S. 535. — 1903.
- COHEIM (O.) — Die Kohlehydratverbrennung in den Muskeln und ihre Beeinflussung durch das Pankreas. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, XXXIV, S. 336. — 1903.

- FEINSCHMIDT (J.). — Ueber das zuckerstörende Ferment in den Organen. *Hofmeisters Beitræge* IV, 1903, S. 511. — 1903.
- SIMACEK (D^r EUGEN). — Ueber die Isolierung der hydrolytischen Enzyme aus dem Pankreas und sein glykolytisches Vermögen. *Centrablatt für Physiologie* XVIII, 1903, S. 209, 217.
- SIMACEK (D^r EUGEN). — Ein Beitrag zu Conheims «Kohlehydratverbrennung in den Muskeln und ihre Beeinflussung durch das Pankreas»; zugleich eine Gegenkritik. *Centrablatt für Physiologie* 1903, XVII, S. 477, 485.
- BATELLI. — La prétendue fermentation alcoolique des tissus animaux. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1903, 137, p. 107, 9, 1086.
- STOKLASA (D^r JULIUS). — Die glycolytischen Enzyme im tierischen Gewebe. *Deutsche med. Wochenschrift*, 1904, S. 198.
- STOKLASA (D^r JULIUS). — Alkoholische Gärung im Tierorganismus und die Isolierung gärungserregender Enzyme aus Tiergeweben. (Unter Mitwirkung von CZERNY, JELINEK, SIMACEK, VITEKE). *Pflügers Archiv*. Bd. 101. H. 7 u. 8. S. 311.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
PRÉFACE	3
CHAPITRE I. — INTRODUCTION	7
CHAPITRE II. — ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION	22
CHAPITRE III. — TECHNIQUE.	25
1. Lavage du foie.	25
2. Dialyse chloroformique.	26
3. Elimination du sucre et du glycogène dans les liquides exsudés	27
4. Répartition du liquide dans deux ballons dont un sert de témoin	29
5. Traitement des liquides au sortir de l'étuve	30
6. Différenciation des sucres par la phénylhydrazine.	31
Résumé des caractères des osazones	33
CHAPITRE IV. — RECHERCHE DES FERMENTS DANS LE FOIE LAVÉ	35
Ferment amylolytique. — Transformation de l'amidon en sucre. .	35
Transformation de l'amidon en sucre	37
Transformation du glycogène	39
Détermination du sucre obtenu dans l'expérience précédente.	41
Le sucre hépatique est-il du glucose ou du maltose?	44
Pouvoir amylolytique.	46
Ferment invertif	48 et 50
Ferment glycolytique.	51
Mise en évidence de la maltase	53
Recherche de l'amylase et de la maltase.	55
Ferment protéolytique.	58
Isolement des ferments amylolytiques	60

	Pages
CHAPITRE V. — RECHERCHES SUR LES FERMENTS ENDO-CELLULAIRES	62
Etude critique des travaux étrangers	62
Expériences préliminaires	69
L'intestin du fœtus contient de la lactase et de l'invertine	71
Persistance de l'invertine et de la lactase	73
La sucrase et la lactase ne dialysent pas	74
Recherche des ferments dans le liquide dialysé	76
CHAPITRE VI. — RECHERCHES DES FERMENTS DANS LA POUDRE DE FOIE	77
Ferment amylolytique	77
Nature du sucre formé dans l'expérience précédente	79
Recherche de l'invertine	81
Recherche de la lactase	84
Recherche de l'inulase	86
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	89
BIBLIOGRAPHIE	91



